

Eine kontrolliert retrospektive Studie über das
Heilungsverhalten des *M. interosseus medius*
des Pferdes unter dem Einfluss regenerativer
Therapien, erfasst mittels Elektronenmikroskopie

EVA-MARIA KLOSE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique 
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. med. vet. Stefan Arnhold

und

aus dem Institut für Rechtsmedizin
des Fachbereiches Humanmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf

Betreuerin: Prof. Dr. med. Ute Lockemann

**Eine kontrolliert retrospektive Studie über das
Heilungsverhalten des *M. interosseus medius* des Pferdes
unter dem Einfluss regenerativer Therapien, erfasst mittels
Elektronenmikroskopie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Eva-Maria Klose

Tierärztin aus Kaufbeuren

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter/-in: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. med. Ute Lockemann

Tag der Disputation: 04.05.2016

In Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Gemeinschaftspraxis für Pferde
Dr. PhD Christina Becker

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	viii
1. Einleitung und Zielsetzung	9
2. Funktion, Anatomie und Histologie des Fesselträgers	11
2.1 Funktion.....	11
2.2 Anatomie	12
2.3 Histologie und Ultrastruktur des Fesselträgers	18
3. Pathologien des M. interosseus medius	26
3.1 Ätiologie der Erkrankung des Fesselträgers	26
3.2 Pathogenese und Pathophysiologie der Erkrankung des Fesselträgers.....	27
3.3 Formen der Erkrankung des Fesselträgers	28
3.3.1 Insertionsdesmopathie.....	29
3.3.2 Desmitis des proximalen M. interosseus medius (PSD).....	29
3.3.3 Desmitis des Fesselträgers im mittleren Bereich (Body lesions).....	30
3.3.4 Desmitis der Fesselträgerschenkel (Branch lesions).....	31
3.3.5 Degenerative Desmitis des M. interosseus medius (DSLSD = Degenerative Suspensory Ligament Desmitis).....	32
4. Heilung.....	34
5. Therapie	37
5.1 Adulte Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	37
5.2 Platelet rich Plasma (PRP)	43
6. Untersuchung und Diagnosestellung von Fesselträgererkrankungen	46
6.1 Klinische Untersuchung	46
6.2 Ultrasonographische Untersuchung	47
6.3 Radiologische Untersuchung.....	49
6.4 MRT	50
6.5 Biopsie.....	50
6.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	52

7. Material und Methoden	58
7.1 Patientengut	58
7.2 Klinische und ultrasonographische Untersuchung (Teil I der Studie)	58
7.3 Therapien	60
7.4 Biopsie Entnahme Technik	62
7.5 Transmissionselektronenmikroskopie und Entwicklung der Bilder	63
7.6 Bildbearbeitung und Auswertung	66
7.7 Statistische Auswertung	72
8. Ergebnisse	74
8.1 Patientengut	74
8.2 Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchungen	78
8.3 Ergebnisse der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder	80
8.3.1 Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen der drei Therapiegruppen im Vergleich hinsichtlich einzelner Messparameter	82
8.3.2 Ergebnisse des ultrastrukturellen Vergleichs der erkrankten Fesselträger mit denen gesunder Pferde	93
8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	95
9. Diskussion	97
9.1 Zielsetzung	97
9.2 Kritik der Methode	98
9.2.1 Biopsientnahme	98
9.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie und Bildbearbeitung	101
9.3 Patientengut	102
9.3.1 Dauer der Erkrankung	103
9.3.2 Betroffene Lokalisation und Gliedmaße	104
9.4 Diskussion der Ergebnisse	105
9.5 Fazit	115
10. Ausblick	117
11. Zusammenfassung	118
12. Summary	120
Literaturverzeichnis	ix

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abk.</i>	<i>Bezeichnung</i>
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AT-MSC	Adipose tissue mesenchymal stem cell
A.	Arteria
ABM	Aspirated bone marrow
bzw.	beziehungsweise
BMMNC	Bone marrow mononucleated cell
COMP	cartilage oligometric matrix protein
CD	cluster of differentiation
CSA	cross sectional area
cMSC	cultivated mesenchymal stem cell
d.h.	das heisst
DSLDD	degenerative suspensory ligament desmitis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EGF	epidermal growth factor
ECGF	epithelial cell growth factor
ES	equines Serum
FT	Fesselträger
FGF	fibroblast growth factor
FBS	foetales bovines serum
ggr.	geringgradig
GAG	Glykcosaminoglykan
GDF-5	growth differentiation factor 5
HGF	hepatic growth factor
IGF	insulin like growth factor
INF	Interferon
IL	Interleukin
kN	kilo Newton
Ligg.	Ligamenta

Lig.	Ligamentum
MRT	Magnetresonanz Computertomographie
MHC	Major Histocompatibility Complex
Max.	Maximum
Med	Median
MHz	Megahertz
MSC	Mesenchymale Stamm- bzw. Stromazelle
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µm	micrometer
Min.	Minimum
MW	Mittelwert
MQA	Mittlerer Quartilsabstand
Mm.	Musculi
M.	Musculus
nm	Nanometer
Nn.	Nervi
N.	Nervus
NSAID	non steroid anti inflammatory drug
OBS	oberflächliche Beugesehne
MC III	Os metacarpale III
MT III	Os metatarsale III
PDGF	platelet derives growth factor
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
PG	Proteoglykan
PSD	proximal suspensory desmitis
R.	Ramus
sog.	sogenannte, sogenannter
SD	Standard Deviation
TBS	tiefe Beugesehne
TGF-β	transforming growth factor beta
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF-α	tumor nekrose Faktor alpha
UTC	ultrasonographic tissue charakterisation

UBTB	Unterstützungsband der tiefen Beugesehne
VK	Variationskoeffizient
VEGF	vascular endothelial growth factor
V.	Vena
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: M. interosseus medius (rot), laterale Ansicht (modifiziert nach Nickel et al. 2001)	15
Abb. 2: Aufteilung der M. interosseus medius in 2 Schenkel. Fesselgelenk des linken Vorderbeins. Mittelfußknochen herausgeklappt (modifiziert nach Nickel et al. 2001)	16
Abb. 3: M. interosseus medius, palmare Ansicht (modifiziert nach Nickel et al. 2001)	17
Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfibrillen des M. interosseus medius im Längs-, und Querschnitt. Querstreifung der Fibrillen im Längsschnitt.....	19
Abb. 5: Schematischer Aufbau der Sehne (modifiziert nach Kastelic et al. 1978 und Liebich 2010).....	22
Abb. 6: Biopsienadel 18 – G x 3 (Dispomed Witt oHg).....	62
Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. Links Original. Rechts Binary.....	66
Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Original	68
Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Erhöhung des Kontrasts um 8%	69
Abb. 10: Binary Darstellung	70
Abb. 11: Watershed Darstellung	71
Abb. 12: Gewähltes Zählfenster	71
Abb. 13: Einteilung der Lokalisationen (modifiziert nach Nickel et al. 2001)	76
Abb. 14: Anteile Fibrillendurchmesser Gruppe A (Placebo) im Verlauf.....	83
Abb. 15: Anteile Fibrillendurchmesser Gruppe B im Verlauf	84
Abb. 16: Anteile Fibrillendurchmesser Gruppe C im Verlauf	85
Abb. 17: 2 Pferde aus Gruppe A mit 0,5 und 1 Monat Erkrankungsdauer	90

Abb. 18: 2 Pferde aus Gruppe B mit 0,75 und 1 Monat Erkrankungsdauer	91
Abb. 19: 2 Pferde aus Gruppe C mit 1 Monat Erkrankungsdauer	92
Abb. 20: 4 Pferde mit 24 Monaten Erkrankungsdauer aus den Gruppen A, B und C (2 Pferde)	93
Abb. 21: Elektronenmikroskopische Darstellung des erkrankten Gewebes des M. interosseus medius. Nur teilweise lineare Anordnung der Kollagenfibrillen	110

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilungsschema der Lahmheitsgrade	59
Tab. 2: Einteilungsschema des Läsionsausmaßes	60
Tab. 3: Studienpferde	74
Tab. 4: Erkrankungsdauer in Monaten	75
Tab. 5: Betroffene Gliedmaße und Lokalisation	77
Tab. 6: Darstellung der Mediane des Fibrillendurchmessers in nm	82
Tab. 7: Darstellung der Mediane der Fibrillenfläche in nm ²	86
Tab. 8: Darstellung der Mediane des Fibrillenumfangs in nm	87
Tab. 9: Darstellung der Fibrillendichte.....	88
Tab. 10: Darstellung des Fibrillenanteils in %	88
Tab. 11: Darstellung der negativen Steigungen (Faktoren pro Zeiteinheit) verschiedener Variablen der Differenzwertanalyse.....	89
Tab. 12: Darstellung der Signifikanzen im Vergleich der Ergebnisse aus Teil II und Teil III der Gesamtstudie. Rot = signifikant, Blau = Trend, grenzwertige Signifikanz.....	94

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Erkrankung des M. Interosseus medius des Pferdes spielt, sowohl bei Sport-, als auch bei Freizeitpferden, eine wichtige Rolle. Der wirtschaftliche Nutzen und Wert eines Pferdes basiert fast ausschließlich auf seiner Brauchbarkeit als Reitpferd. Ein Sehnenschaden, entstanden durch chronische Über-, bzw. Fehlbelastung oder entstanden durch ein spontanes Trauma führt fast immer zu einer Lahmheit des Pferdes und damit zu einem vorübergehenden Ausfall. Insgesamt sind nach Pick (1986) bis zu 14% aller Lahmheiten auf Sehnenprobleme zurückzuführen.

Der lange Heilungsverlauf eines beschädigten Sehnenbandapparates steht schon seit längerer Zeit im Fokus der Wissenschaft. Dementsprechend vielfältig und experimentell sind heutzutage die Therapiemöglichkeiten von Sehnenenerkrankungen. Insbesondere dem Bereich der zellvermittelten Heilung werden große Erfolge zugesprochen. Bisher fehlte es jedoch an entsprechenden Studien über den Erfolg der regenerativen Therapien. Als Gründe hierfür wurden die technischen Schwierigkeiten, entsprechende Läsionen (core-lesions) in der Sehne zu induzieren, oder die fehlende Besitzerakzeptanz von Studien mit Placebo-Gruppen genannt (Koch et al. 2009). Soweit existieren nur Studien ohne Kontrollpferde, bzw. es wurde nur der historische Vergleich von erkrankten Pferden und unterschiedlichen angewandten Therapieverfahren, inklusive konservativer Therapie, durchgeführt (Fortier u. Travis 2011, Rijkenhuizen et al. 2007).

In folgender Arbeit soll nun die Heilung des Fesselträgers unter dem Einfluss regenerativer Therapien auf ultrastruktureller Ebene mittels Elektronenmikroskopie erfasst werden. Randomisiert wurden 30 Studienpferde mit vorab diagnostiziertem Fesselträgerschaden in drei Gruppen eingeteilt, mit mesenchymalen Stammzellen (MSC), platelet rich plasma (PRP) oder einem Placebo (Dulbecco's Modified Eagle Medium) behandelt und über den Zeitraum von 3 darauf folgenden Monaten untersucht. Das Ziel dieser Studie ist es, den Heilungsverlauf einer Fesselträgerläsion über den Zeitraum von 3 Monaten auf ultrastruktureller Ebene vergleichend für die verschiedenen Therapiegruppen zu erfassen. Kernpunkt hierbei ist die Fragestellung einer möglicherweise besseren Heilung unter dem Einfluss von MSC oder PRP. Die Untersuchung der Ultrastruktur erfolgt durch die Entnahme von

Biopsien aus dem geschädigten Bereich und die Untersuchung der entnommenen Proben mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops. Dabei werden Kollagenfibrillen in ihrem Querschnitt betrachtet und analysiert.

Ein weiterer zu differenzierender Aspekt ist die Qualität des regenerierten Gewebes. Durch Reparation entsteht zunächst ein Ersatzgewebe das sich von dem einer gesunden Sehne unterscheidet. In wieweit durch regenerative Therapien die Bildung eines qualitativ hochwertigeren Gewebe erzielt werden kann, wird ebenfalls überprüft. Als Grundlage hierfür dienen die ultrastrukturellen Untersuchungen nach gleicher Methode von gesunden Fesselträgern, durchgeführt im Laufe einer vorangegangenen Doktorarbeit.

Die klinische und sonographische Untersuchung der Studienpferde ist bereits abgeschlossen und wurde in einer vorangegangenen Doktorarbeit von Frau Dr. Melanie Banse (2011) veröffentlicht. Die Ergebnisse aus diesem Teil werden in diese Arbeit mit einbezogen.

2. Funktion, Anatomie und Histologie des Fesselträgers

2.1 Funktion

Der Fesselträger trug während der phylogenetischen Entwicklung des Pferdes dazu bei das Acropodium, die Fußspitze, aufzurichten und von der Plantigradie in die heutige Unguligradie überzugehen. Als Zehenspitzenzünger ist es dem Pferd möglich seine raumgreifenden Bewegungen und sein schnelles Fluchtverhalten auszuführen. Zudem unterstützt der Fesselträger ein fast passives Belasten der Gliedmaße im Stand. Dies ermöglicht dem Pferd längere Ruhephasen mit gleichzeitig permanenter Fluchtbereitschaft (Schulze u. Budras 2008).

Der Fesselträger, oder auch Fesseltrageapparat genannt (Salomon et al. 2005) ist somit ein wichtiger stabilisierender Bestandteil der Bewegungsfunktion der Gliedmaßen des Pferdes. Er verhindert durch seine statisch-elastische Fixierung des Fesselgelenks eine zu starke Hyperextension des Fesselgelenks und verhindert somit den Bodenkontakt des Fesselkopfes (Girtler 2001, Nickel et al. 2001, Wissdorf et al. 2002). Neben der oberflächlichen und der tiefen Beugesehne trägt der Fesselträger die Hauptlast in der Bewegung und im Stand. In einer Studie von Forsell (1915) wurde festgestellt, dass auch nach Durchtrennung der tiefen und oberflächlichen Beugesehne sich die Stellung des Fesselgelenks im Stand nicht veränderte. Besonders im Galopprennsport oder nach dem Sprung wirken Kräfte von 10-30 kN auf die jeweilige Gliedmaße ein (Geyer 2006). Der Fesselträger wird dabei bei einem 500kg schweren Pferd mit einer Kraft von 15,3-15,8 kN belastet. Unter diesen Belastungen kommt es zu einer Spitzendehnung des Gewebes des M. interosseus medius von ca. 7,9%. Dies entspricht 80% der in vitro bestimmten Rupturgrenze des Fesselträgers (Stanek 2004). Neben den Beugesehnen speichert auch der M. interosseus medius während der Bewegung elastische Energie. Das Speicherpotential hilft dem Pferd seine Muskelenergie effizient zu verwalten. Durch diesen Mechanismus kann wertvolle metabolische Energie, welche bei Muskularbeit benötigt wird, gespart werden (Biewener 1998, Patterson-Kane et al. 2012, Soffler u. Hermanson 2006). Die Stützbeinphase der Bewegung des Pferdes besteht aus Stützen und Stemmen. Zu Beginn der Stützbeinphase beginnt sich das Fesselgelenk zu überstrecken. Am tiefsten Punkt erreicht das Fesselgelenk seine maximale

Hyperextension (Girtler 2001). Diese beträgt gemessen vom Standwinkel ausgehend 23,6° an der Vorderextremität und 25,1° an der Hinterextremität (Back et al. 1995). Bis zum Zeitpunkt des Übergangs in die Phase des Stemmens hat der M. interosseus medius potentielle Energie aufgenommen. Diese kann er nun in der Aufwärtsbewegung der Gliedmaße in Form von kinetischer Energie durch die Federwirkung der Sehne wieder abgeben (Alexander 1988). Sie beträgt jedoch nur etwa 40% der aufgenommenen Energie. Die restliche Energie wird in Form von Wärme frei (Stanek 2004).

2.2 Anatomie

Der Fesseltrageapparat setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen welche eine gemeinsame Wirkungseinheit bilden.

Der Hauptbestandteil ist der M. interosseus medius. Er verläuft an der Vorder- und Hintergliedmaße in einer anatomischen Rinne gebildet aus der palmaren bzw. plantaren Fläche des Os metacarpale III bzw. des Os metatarsale III und den seitlich begrenzenden den Axialflächen der Griffelbeine (Stashak 1989). Der M. interosseus medius lässt sich in drei Abschnitte einteilen:

- a) Muskelkopf mit den Ursprungssehnen und dem Muskelhilus, auch als proximaler Anteil bezeichnet
- b) Muskelbauch, oder Körper (body)
- c) Muskelendigung mit seinen Endsehnen oder Fesselträgerschenkeln

(Dyson et al. 2008, Schulze u. Burdas 2008)

An der Vordergliedmaße hat der MI seinen Ursprung am proximalen Ende der palmaren Fläche des Os metacarpale III (Budras u. Röck 2000, Nickel et al. 2001), sowie an der distalen Reihe der Karpalgelenksknochen (Bischofberger et al. 2006, König u. Liebich 2005, Stashak 1989).

Der zusätzliche Ursprung am Lig. carpi radiale wird auch vermehrt beschrieben (Budras u. Röck 2000, Nickel et al. 2001, Salomon et al. 2005).

Die paarigen Anteile der Ursprungssehne des M. interosseus medius laufen ca. 8mm distal des proximalen Endes des Röhrebeins zusammen. Davor sind sie durch einen Anteil bestehend aus Binde-, und Fettgewebe voneinander annähernd getrennt. In diesem Dreieck befindet sich auch der Muskelhilus, der Haupteingang für die

versorgenden Gefäße und Nerven. Die beiden Anteile der Ursprungssehne unterscheiden sich an der Vordergliedmaße voneinander. Der mediale Anteil stellt sich flach dar, der laterale Anteil dagegen ist insgesamt runder und dicker (Bischofberger et al. 2006).

An der Hintergliedmaße entspringt der M.interosseus medius an der distalen Reihe der Tarsalgelenksknochen sowie der proximoplantaren Fläche des Röhrbeins. Lempe (2007) konnte durch die magnetresonanz-tomographische (MRT-) Untersuchung des Fesselträgers der Hintergliedmaße des Pferdes zudem dessen Ursprung im plantaren Bereich der Gelenkkapsel des Tarsometatarsalgelenks darstellen. In dieser Studie konnte im Vergleich zu der MRT-Studie von Bischofberger et al. (2006) eine Verbindung des Fesselträgers zu den Knochen der distalen Sprunggelenksreihe nicht festgestellt werden. Als zusätzliche Struktur entspringt der M. interosseus medius an der Hintergliedmaße mit seinen 2 Köpfen aus dem Bereich der Ligg. tarsometatarsalia plantaria (Wissdorf et al. 2002). Der Ursprung des MI ist an der Hintergliedmaße insgesamt etwas lateral und nicht zentral plantar angelegt. Die Trennung der beiden Ursprungssehnern ist weniger deutlich als an der Vordergliedmaße. Hierbei sind jedoch auch beide Teile gleichermaßen ausgebildet (Bischofberger et al. 2006). Diese angedeutete Zweiteilung wurde auch von Lempe (2007) im MRT-Transversalschnitt beobachtet.

Eine zusätzliche lange Ursprungssehne des MI wird in einer Studie von Schulze u. Budras (2008) beschrieben. Diese zieht ausgehend vom der lateralen Seitenfläche des Calcaneus über den vierten Tarsalknochen, wo sie ebenfalls inseriert, weiter zum lateralen Anteil der Ursprungssehne. Der laterale Teil der Ursprungssehne besteht demnach aus der langen Ursprungssehne und der darunter liegenden kurzen Ursprungessehne, welche sich dann vereinigen (Schulze u. Budras 2008).

Als weitere Besonderheit der Hintergliedmaße wird der Verlauf der sehr starken Fascia plantaris beschrieben. Diese heftet sich straff an beide Griffelbeine an und schließt den Fesselträger somit ein. Dies wird als klinisch relevant in Betracht gezogen, da durch die Eingrenzung im Falle einer Umfangsvermehrung des M. interosseus medius ein Kompartmentsyndrom entstehen kann (ähnlich dem Karpaltunnelsyndrom). Durch den sich aufbauenden Druck, der nicht entweichen kann, werden die anliegenden Nervenbahnen komprimiert. Dies führt zu

Schmerzhaftigkeit und damit auch zu vermehrter Lahmheit der Pferdes (Lempe 2007, Wissdort et al. 2002).

Der Körper der M. interosseus medius, oder Muskelbauch verläuft weiter Richtung distal, enganliegend in seiner beschriebenen Rinne. Er wird überlagert von der tiefen und der oberflächlichen Beugesehne.

Im distalen Drittel bis zum distalen Viertel (Stashak 1989) teilt sich der M. interosseus medius in seine beiden Schenkel oder Muskelendigungen. Die beiden Schenkel inserieren an der abaxialen Fläche der jeweiligen Gleichbeine (Soffer u. Hermanson 2006). An dieser Stelle geben die beiden Schenkel je ein Unterstützungsband über lateral nach dorsal zur gemeinsamen Strecksehne ab (Nickel et al. 2001, Salomon et al. 2005, Wissdorf et al. 2002).



Abb. 1: M. interosseus medius (rot), laterale Ansicht (modifiziert nach Nickel et al. 2001)

Neben dem M. interosseus medius wird der gesamte Fesselträger noch durch folgende Strukturen ergänzt: Das Lig. sesamoidem rectum, welches von den Gleichbeinen nach distal ziehend am Fesselbein inseriert und die Ligg. sesamoida obliqua (Nickel et al. 2001, Salomon et al. 2005).

Das Lig. palmare, welches die beiden Gleichbeine verbindet und Teil des proximalen Gleitkörpers für die tiefe Beugesehne bildet, wird teilweise auch der funktionellen Einheit des Fesseltrageapparates zugeordnet (Wissdorf et al. 2002), ebenso die Gleichbeine an sich sowie die Ligg. sesamoida (Kainer 1989b). Die Gleichbeine haben die Funktion als Knocheneinlagerungen in die Sehnenstrukturen als Gleitdruckkörper zu fungieren (Nickel et al. 2001).

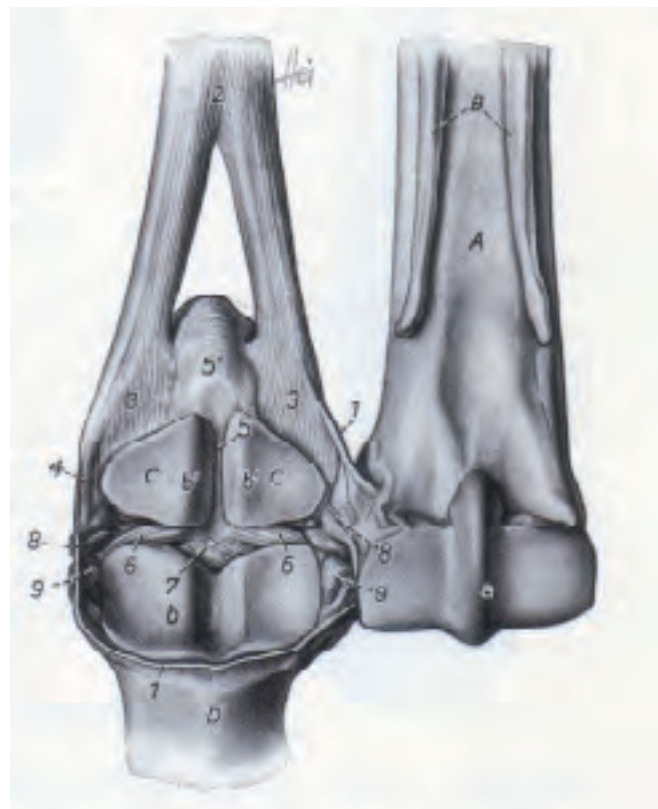


Abb. 2: Aufteilung der M. interosseus medius in 2 Schenkel. Fesselgelenk des linken Vorderbeins. Mittelfußknochen herausgeklappt (modifiziert nach Nickel et al. 2001)

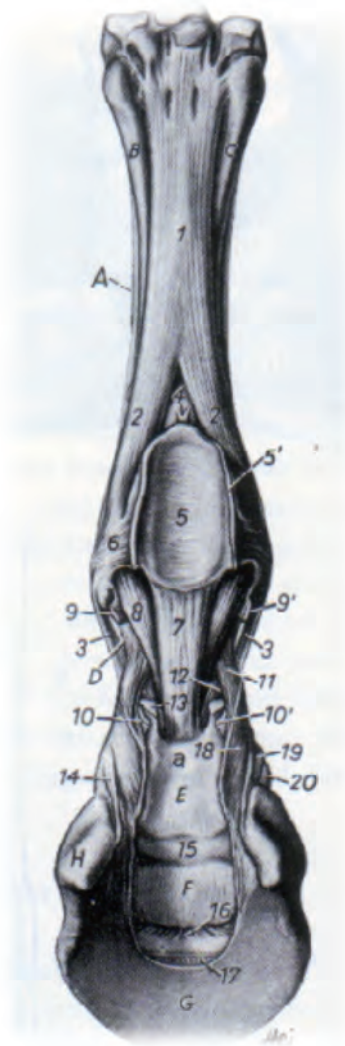


Abb. 3: M. interosseus medius, palmare Ansicht (modifiziert nach Nickel et al. 2001)

Ergänzend sind noch die Mm. interossei medialis et lateralis zu erwähnen. Die beiden nur rudimentär ausgebildeten Muskeln, von Stärke eines Grasshalms in blass rosa Farbe, entspringen an der axialen Fläche der Griffelbeinbasis und verlaufen enganliegend in der Rinne zwischen Griffelbein, Os metatarsale III bzw. Os metacarpale III und M. interosseus medius bis zum Griffelbeinköpfchen. Dort haben sie ihren Ansatz und strahlen zudem in das Sporn-Griffelbein-Band aus (Nickel et al. 2001). Anders beschrieben enden die Muskeln in der Unterschenkelfaszie und medial und lateral in der Verstärkung dieser, bzw. im Fesselringband. Die Funktion dieser Muskeln ist von untergeordneter Bedeutung. Bei Frakturen der Griffelbeine kommt es unter anderem durch den Zug der Mm. interossei medialis et lateralis zur Dislokation der distalen Fraktarenden (Wissdorf et al. 2002).

Die Innervation des Fesselträgers geschieht am Vorderbein über den R. profundus des N. palmaris lateralis, der auch Fasern des N. medianus und der N. ulnaris enthält (Kainer 1989a u. 1989b, Keg et al. 1996, Muyelle et al. 1998, Wissdorf et al. 2002). Er gibt Äste an den M. interosseus medius Ursprung ab bevor er sich in seine beiden tiefen Nervenbahnen, die Nn. metacarpi palmaris und lateralis aufteilt (Lischer et al. 2006). Diese beiden Nerven perforieren den Fesselträger und verlaufen, zusammen mit den begleitenden Blutgefäßen, weiter Richtung distal, beidseits in den anatomischen Rinnen, gebildet aus Röhrbein und Griffelbeinen (Kainer 1989b). Am Hinterbein wird der M. interosseus medius vom R. profundus des N. plantaris lateralis aus dem N. tibialis (Dyson 2000) innerviert. Weiter distal verläuft dieser Nerv ähnlich wie an der Vordergliedmaße (Kainer 1989b).

2.3 Histologie und Ultrastruktur des Fesselträgers

Der M. interosseus medius besitzt zum Hauptteil einen bandartigen Charakter mit einem variablen Anteil an Muskelfasern. Somit besteht seine Grundeinheit überwiegend aus Sehnengewebe (Soffler u. Hermanson 2006).

Sehnen bestehen zu 60-70% aus Wasser und zu ca. 30% aus Trockensubstanz. Diese setzt sich aus Kollagen (etwa 80% der Trockenmasse) und einer nicht-kollagenen Matrix zusammen. Die nicht-kollagene Matrix enthält Tendozyten, Blutgefäße, Nerven, sowie unterschiedliche Glykoproteine und Proteoglykane (Liebich 2004, Stanek 2004). Die Synthese des Kollagens ist eine spezifische Leistung der Tendozyten und Fibroblasten, bzw. deren Abkömmlinge, der Chondro- und Osteoblasten. Tendozyten stellen eine modifizierte Form von Fibroblasten dar. Während der intrazellulären Phase der Kollagensynthesen werden an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums Polypeptidketten gebildet (Liebich 2004). Diese Ketten sind in ihrem Aufbau nur geringfügig unterschiedlich. Die Aminosäuresequenz verläuft dabei stets mit Glyzin an jeder dritten Position.

Daraus ergibt sich folgendes Schema: Gly-Xaa-Yaa, wobei Xaa und Yaa jede beliebige Aminosäure sein können, häufig jedoch Prolin und Hydroxyprolin. Die synthetisierten Ketten bilden im nächsten Schritt auf molekularer Ebene eine Triple Helix aus drei Polypeptidketten. Diese entsprechen einer α -Kette und werden als Prokollagen bezeichnet. Die intrazellulär hergestellten α -Ketten werden dann extrazellulär befördert. Dort wird durch enzymatische Abspaltung von N- und C-

Telozeptiden die Fähigkeit der Bindung mit anderen Ketten ermöglicht. Durch Aneinanderlagern von mehreren Triple Helices kommt es zur Bildung von D-periodischen ($D = 67\text{nm}$), quer gestreiften Fibrillen (Tropokollagen, Länge ca. 280nm). Die Querstreifung kommt durch Lücken (gaps) der äußeren längs verlaufenden Helices zustande. Die Helices, bzw. Fibrillen sind entweder unipolar mit dem Verlauf vom N- zum C-Terminus, oder bipolar (N-N-Terminus). Eine weitere Verbesserung der Stabilität bilden kovalente Querverbindungen unter den Helices. Gebildet werden die Brücken vor allem durch enzymatische oxidative Desaminierung von Lysin und Hydroxylysin. Die genaueren Vorgänge der Formation von Kollagenfibrillen sind nicht bekannt. Es wird generell von dem Mechanismus der „collagen fibril self assembly“ gesprochen“ (Kadler et al. 1996). Liebich (2004) beschreibt die Annahme der elektrostatischen Anziehung benachbarter Tropokollagenmoleküle als Ursache für die Bildung der Kollagenfibrillen.

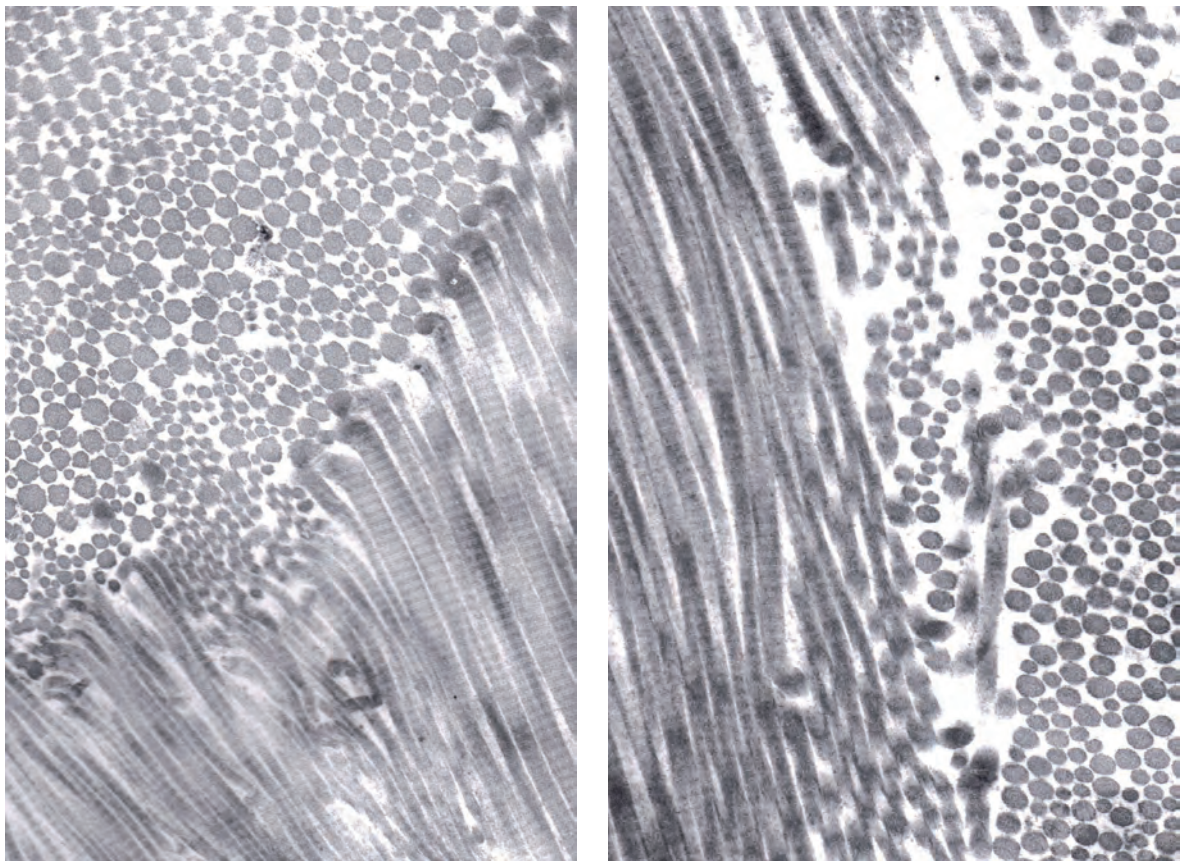


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfibrillen des M. interosus medius im Längs-, und Querschnitt. Querstreifung der Fibrillen im Längsschnitt

Insgesamt gibt es über 20 verschiedene Kollagen Typen. Sie unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz ihrer Ketten und in der Anzahl der Zuckerreste (Liebich 2004, Kadler et al. 1996). Das Kollagen der Sehne des Pferdes besteht zu etwa 95% aus Kollagen Typ I, bestehend aus zwei identischen $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Ketten Variante $\{[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)\}$. Typ I Kollagen weist meist einen Durchmesser von 70-260nm auf (Liebich 2004, Mohr 1978, Williams et al. 1980). Der Restanteil des Kollagens besteht aus Typ III und IV Kollagen. Typ III Kollagen findet sich hauptsächlich im Endotenon. Der Gehalt an Kollagen Typ III nimmt mit dem Lebensalter zu. Typ III Kollagenfibrillen besitzen einen deutlich geringeren Durchmesser als Typ I Kollagenfibrillen (Goodship et al. 1994). In gesundem Sehnengewebe spielt dieser Kollagentyp eine untergeordnete Rolle. Es lassen sich hierbei mitunter nur 1% Typ II Kollagen isolieren (Silver et al. 1983). Die weitere Bildung einer Sehne erfolgt durch weitere Quervernetzung (molecular cross links) der einzelnen Kollagenfibrillen (Kadler et al. 1996). Dadurch kommt es zu Bildung von Kollagenfasern. Diese besitzen einen Durchmesser von 1-20 μ m und lassen sich lichtoptisch nach Anfärbung darstellen. Kollagenfasern ordnen sich im lockeren Bindegewebe leicht gewellt an. Diese Erscheinung wird als „crimp pattern“ bezeichnet. In strafferen Geweben wie Faszien verlaufen die Kollagenfasern meist scherengitterartig geflochten. In Gewebe, welches unter hoher Zugkraft steht, wie Sehnen und auch der M. interosseus medius des Pferdes, sind die Fasern überwiegend parallel, entlang der Längsachse verlaufend gewunden angeordnet (Liebich 2004, Williams et al. 1980). In Phasen geringer Belastung, wie der Vorführphase der Gliedmaße, formen sich die Kollagenfasern in ihre wellige Struktur zurück (Goodship et al. 1994).

Patterson-Kane et al. (1997) untersuchte den Winkel der wellenförmigen Formation der Kollagenfasern der oberflächlichen Beugesehne von Neuseeländischen Wildpferden unterschiedlichen Alters. Die Pferde wurden aufgrund von Überpopulation gekeult. Bei der Untersuchung der Ultrastruktur wurde eine Abnahme des Wellenwinkels der Kollagenfasern im Zentrum der Sehne mit zunehmendem Alter festgestellt. In der Peripherie blieb dieser jedoch konstant. Ebenfalls unverändert stellten sich der durchschnittliche Durchmesser und die Periodizität der Kollagenfasern in den unterschiedlichen Altersklassen dar.

Die nächsten größeren Einheiten der Sehne stellen zu Bündeln zusammengefasste Kollagenfasern dar (Primärbündel, Durchmesser von 80-180 μ m). Diese werden von

lockerem Bindegewebe umgeben. In diesen bindegewebigen Septen sind modifizierte Fibroblasten, die Tendozyten integriert. Sie richten sich im Aufbau nach den parallel angeordneten Kollagenfasern und schmiegen sich ihnen langgezogen, angewinkelt und platt an. Die Tendozyten sind unter Anderem für die Bildung der inneren Hüllschichten, dem Endotenonium (Endotenon), zuständig. Mehrere Kollagenfaserbündel werden weiter umgeben von einem Peritenonium (Peritenon) und bilden die Sekundärbündel. Das Peritenonium besteht ebenfalls aus lockerem Bindegewebe und Tendozyten, sowie Nerven, Blut- und Lymphgefäßen. Die Sehne im Gesamten wird zuletzt von dem Epitenonium (Epitenon) umhüllt (Liebich 2004, Williams et al. 1980).

Das Kollagen unterliegt wie viele andere Körpergewebe konstanter Neubildung. Das Kollagen der Sehne wird vermutlich alle 6 Monate komplett neu aufgebaut. Spezialisierte Enzyme, die Matrix-Metalloproteinasen werden dabei für den Kollagenabbau von den Fibroblasten sezerniert (Rennie 1999).

Die Ultrastruktur der Sehnen des Pferdes wurde bisher nur anhand der oberflächlichen Beugesehne des Pferdes (OBS) analysiert. Fetal und perinatal liegt der mittlere Fibrillendurchmesser der OBS bei ca. 100nm. Bei dem adulten Pferd zeigt sich dann ein bi-, oder trimodales Verteilungsmuster. Bei dreijährigen Pferden befinden sich die Fibrillen in der Größenordnung um 35nm bzw. 165nm. Bei noch älteren und ausgewachsenen Pferden lassen sich aufgrund der Verteilungshäufigkeit die mittleren Fibrillendurchmesser in 3 Gruppen einteilen: 40nm, 120nm und >200nm (Goodship et al. 1994, Parry et al. 1978b). Birch et al. (1999) analysierte hingegen keinen Unterschied des mittleren Fibrillendurchmessers der OBS zwischen jungen und erwachsenen Pferden. Es zeigte sich jedoch ein niedrigerer Zellgehalt bei älteren Pferden. Becker et al. (2001) untersuchten Warmblutfohlen während der Aufzucht. Über 5 Monate wurde eine Gruppe von Fohlen unter Boxenruhe gestellt mit punktuellen Laufbandtraining. Eine andere Gruppe an Fohlen gleicher Rasse und gleichen Alters wurde in uneingeschränkter Bewegung gehalten. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Zugfestigkeit und des Durchmessers der Beugesehnen bei der Gruppe in freier Bewegung. Durch anschließende Bewegungseinschränkung ließ sich diese Beobachtung reversieren. Die Ergebnisse korrelierten mit einer Erhöhung des Zellgehaltes und des Gehaltes an Glykosaminoglykanen (GAGs) in der OBS. Bei älteren Pferden ist die Anpassung

des Sehngewebes und die Möglichkeit der Umgestaltung des ultrastrukturellen Aufbaus der Sehne limitiert. Es lässt sich aber beobachten, dass der mittlere Fibrillendurchmesser mit zunehmendem Alter abnimmt (Parry et al. 1987b).

Der ultrastrukturelle Aufbau des Fesselträgers des Pferdes wurde im Teil II dieser Studie erstmals analysiert. Dabei wurde nach gleicher Methode dieser Studie vorgegangen, der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Biopsien aus dem Fesselträger des Pferdes. Die Gewebeproben wurden von Schlachtpferden mittleren Alters gewonnen. Die gewählten Pferde erlitten prä mortal keine Erkrankung des M. interosseus medius.

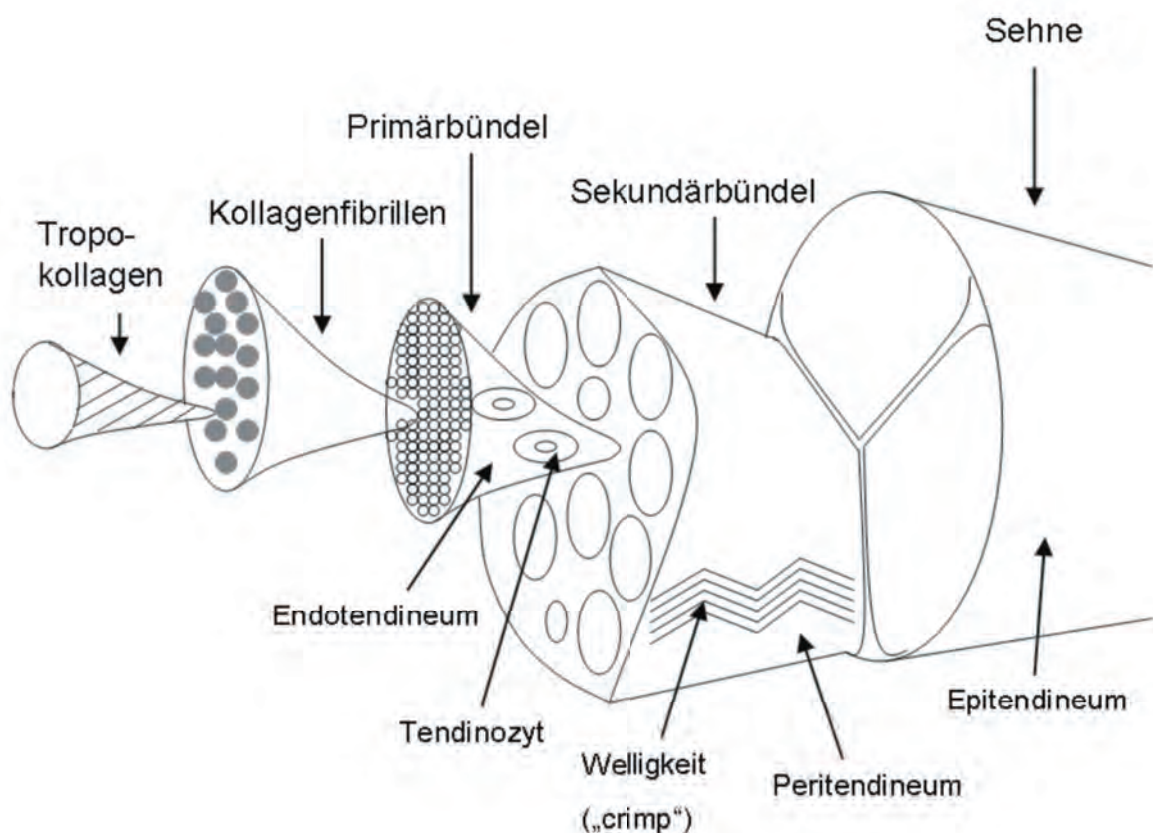


Abb. 5: Schematischer Aufbau der Sehne (modifiziert nach Kastelic et al. 1978 und Liebich 2010)

Neben der Kollagen-Komponente spielen noch die Proteoglykane (PG) eine essentielle Rolle bei der Instandhaltung der Sehne und Ausführung ihrer Funktion. Bausteine der Proteoglykane sind die Glykosaminoglykane (GAGs). Diese werden über ein Protein an Hyaluronsäure gekoppelt. Zu den wichtigsten Vertretern gehören:

Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat. Proteoglykane weisen durch ihre große Oberfläche eine hohe Wasserbindungsfähigkeit auf und dienen als Wasser- und Ionenspeicher. Sie garantieren die hohe Gleitfähigkeit und Geschmeidigkeit in der Dehnung und ermöglichen so eine hohe Kapazität der Sehne, großen Kräften entgegenzuwirken (Yoon u. Halper 2005). Zudem beeinflussen sie die fibrilläre Anordnung (Goodship et al. 1994).

Zugehörig der Leucin-reichen Proteoglykanfamilie ist das Decorin ein wichtiger Bestandteil der nicht kollagenen Matrix des Sehnengewebes. Die Rolle des Decorin wurde bereits näher anhand von Knockout-Mäusen von Reed u. Izzo (2003) untersucht. Bei diesen Mäusen wurde das Decorin-Gen deaktiviert. Morphologisch weisen diese Mäuse eine schlaffere Haut auf. Auf ultrastruktureller Ebene ließen sich ebenfalls im Vergleich zu gesunden Mäusen ohne Gendefekt Unterschiede in Kollagenfibrillendurchmesser- und -dichte feststellen. Die Knockout-Mäuse hatten eine geringere Dichte an Kollagenfibrillen und eine größere Variabilität im Umfang der Fibrillen. Insgesamt wird dem Decorin eine wichtige Rolle für die Bildung und Instandhaltung des kollagenen Bindegewebes zugeordnet (Reed u. Izzo 2003, Smith et al. 2002). Andere Leucin-reiche Proteoglykane der Sehne sind des Weiteren: Biglykan, Fibromodulin und Lumican. Sie nehmen alle aktiv an der Fibrillogenese teil (Yoon u. Halper 2005). Die Proteoglykane lagern sich im Sehnengewebe orthogonal in regulären Abständen an die Kollagenfibrillen an. Je größer der Fibrillendurchmesser, desto geringer ist der Anteil an gebundenen Proteoglykanen (Franchi et al. 2007).

Ein weiteres nennenswertes Protein der nicht-kollagenen Sehnenmatrix ist das Cartilage Oligometric Matrix Protein (COMP). Es hat die Rolle eines Katalysators für die Fibrillogenese und liegt gebunden an Kollagen Typ I und III vor (Södersten et al. 2006). COMP übernimmt eine organisierende Funktion beim Wachstum von Sehnengewebe (Smith et al. 2002).

Beide Proteine werden zu wissenschaftliche Zwecken genutzt. Ein erhöhter Gehalt an COMP und Decorin spiegelt eine vermehrte Fibrillogenese wieder. Schnabel et al. (2008) ermittelte den Gehalt an Decorin- und COMP-mRNA mittels quantitativer PCR in kulturell angereichertem Sehnengewebe. Dabei wurden dem Gewebe verschiedene wachstumsfördernde Agenzien zugefügt (PRP, ABM, Plasma, Blut, PPP). Durch die Bestimmung des COMP- und Decorin-Gehalts konnten, neben weiteren Anhaltspunkten, unterschiedliche Verhalten der Gruppen analysiert werden.

COMP wird vermehrt gebildet im Beisein von Wachstumsfaktoren. Ein geringer Gehalt von COMP findet sich dagegen in fibrosiertem Narbengewebe (Schnabel et al. 2008, Smith et al. 2006).

Rigozzi et al. (2010) ordnet die interfibrilläre Gleitfähigkeit der Sehne den vorhandenen GAG und PG zu. Sehnengewebe, die aus überwiegend dicken Kollagenfibrillen bestehen, besitzen eine geringere Fibrillenoberfläche als Sehnengewebe aus dünnen Kollagenfibrillen. Die Fibrillenoberfläche korreliert mit der Anzahl an angelagerten Proteoglykanen. Sehnen mit dicken Kollagenfibrillen besitzen einen geringeren Gehalt an PG. Demnach sind diese Sehnen steifer als Sehnen deren Fibrillen einen geringeren Durchmesser aufweisen (Rigozzi et al. 2010).

Es gibt in der Literatur unterschiedliche Angaben zum Anteil an Muskelfasern des M. interosseus medius.

Lempe (2007) untersuchte mittels MRT die Morphometrie des Fesselträgers der Hintergliedmaße von 26 Pferden. Bemessen wurde der Gehalt in einem Transversalquerschnitt durch den M. interosseus medius 3cm distal des Tarsometatarsalgelenks. Der Muskelanteil variierte zwischen 18% und 58%. Im Median lag er bei 30%. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und der individuellen Einlagerung von Muskelfasern festgestellt werden (Lempe 2007).

Anders als in einer Studie von Schwarzkopf (2000). In dieser Studie wurde bei Untersuchung der Vordergliedmaße ein Muskelanteil von 0,3% bis 40% ermittelt, der mit höherem Körpergewicht und zunehmendem Alter signifikant geringer wurde.

Ein deutlich geringer Anteil an Muskelfasern (2,1% bis 10%) wurde bei der Analyse von Fesselträgern von Vollblutpferden erfasst (Dyson et al. 1995). Ähnliche Werte der Studie von Lempe (2007) erfasste die Untersuchung von Sehnenquerschnitten bei Warmblutpferden von Oberbeck (1992). Die Ergebnisse ihrer histologischen Untersuchungen betrugen einen 30-40%igen Muskelfaseranteil. Eine weitere histologische Untersuchung zur planimetrischen Vermessung der Sehnen- und Muskelgewebe ergab einen signifikant geringeren Anteil von Muskelgewebe bei älteren Tieren (Schwarzkopf 2000).

Einige Autoren geben das Vorhandensein von Muskelfasern nur beim Fohlen, nicht aber beim erwachsenen Pferd wieder (Dyce et al. 1996, Seiferle u. Frewein 1992).

Einen 2-11%igen Anteil beschreibt Wilson et al. (1991), wobei Warmblüter bis zu 40% mehr Muskelfasern aufweisen als Vollblüter. Dieser lässt sich in zwei längs orientierten Muskelfaserbündeln darstellen. Der muskulöse Anteil formiert sich proximal außen, d.h. medial und lateral und zieht in Richtung distal in einem Winkel von 45° nach medial (Wilson et al. 1991). Dabei gibt es einen morphologischen Unterschied an der Vorder- und Hintergliedmaße. An der Vordergliedmaße organisieren sich die Muskelfasern in zwei halbmondförmigen Bögen deren geöffnete Seite einander zugewandt ist (Rooney 1973). Diese Formation ist proximal deutlich definiert, weiter distal jedoch weniger deutlich. An der Hintergliedmaße lassen sich die Muskelbündel mehr geradlinig geformt und parallel zueinander beobachten (Bischofberger et al. 2006, Wilson et al. 1991).

Soffler u. Hermanson (2006) untersuchten den M. interosseus medius histochemisch und immunhistochemisch bezüglich seines Muskelfasergehalts. Ergebnis dieser Studie war zunächst, dass sich der Großteil der Muskelfasern des Fesselträgers in seinen proximalen drei Vierteln befindet, wobei auch in den Schenkeln vereinzelte Fasern auftreten. Es handelt sich dabei zu ca. 95% um Muskelfasern vom Typ I (slow-twitch) und zu 5% um Muskelfasern vom Typ IIa. Typ I Muskelfasern sind sehr ausdauernd und fast ermüdungsresistent. Im Vergleich zu den Typ II Fasern bringen sie nur eine geringere Kraft auf. Sie besitzen aber ein hohes oxidatives Potential. Typ II Fasern ermüden schnell und haben einen hohen Verbrauch an anaerober Energie (Soffler u. Hermanson 2006).

Innerhalb der Muskelbündel ordnen sich die einzelnen Muskelfasern gefiedert in einem Winkel von 45° an. Die Fasern waren ~ 764µm lang. Im Vergleich zur restlichen Muskulatur der Gliedmaße des Pferdes handelt es sich dabei um relativ kurze Muskelfasern. Im Durchmesser allerdings glichen die Fasern denen anderer Muskeln wie z.B. des M. triceps brachii. Eine weitere Beobachtung waren kleine Ansammlungen von Adipozyten, welche die Muskelfaserbündel umgeben (Soffler u. Hermanson 2006). Zum Teil hüllen die Adipozytenansammlungen die Muskelfasern vollständig ein. Das Fettgewebe wirkt stoßabsorbierend (Lempe 2007).

3. Pathologien des M. interosseus medius

Die Erkrankung des Fesselträgers wird weiträumig mit dem Begriff der Desmitis bezeichnet. Dieser Begriff beinhaltet die Entzündung von Bändern (Mc Ilwraith 1989). Da es sich bei dem M. interosseus medius um einen rudimentären Muskel mit bandartigem Charakter handelt, wurde ihm diese Bezeichnung zugeordnet.

In der Orthopädie der Pferdemedizin stellen Desmitiden ein häufig vorkommendes Problem dar. Die Leistungsfähigkeit von Pferden aller reiterlichen Disziplinen wird durch diese Form der Erkrankung erheblich beeinträchtigt (Rijkenhuizen et al. 2007). Erkrankungen durch zu hohe Beanspruchung des Fesselträgers und der oberflächlichen Beugesehne sind die mit am häufigsten beobachteten muskuloskeletalen Erkrankungen des Pferdes (Goodship 1993). Kasashima et al. (2004) ermittelten aus einer Population von 10.262 Vollblut Rennpferden im Training oder Rennen über den Zeitraum von einem Jahr ein Vorkommen von 3,61% an Pferden mit einer bestehenden Erkrankung des Fesselträgers.

Bei Vollblut- und auch bei Trabrennpferden kommt es besonders häufig zur Erkrankung des M. interosseus medius (Schneider 2006)

3.1 Ätiologie der Erkrankung des Fesselträgers

Als Auslöser der Erkrankung wird die einmalige oder wiederholte Überschreitung der Dehnungsgrenze des Fesselträgers unter Beanspruchung betrachtet. Dabei kommt es entweder direkt zu einer Erkrankung, oder zunächst zu fibrillären Mikroläsionen. Diese können bei weiterer Belastung zu Entzündungen und größeren Schäden führen (Schneider 2006).

Ursächliche Faktoren sind hohe Laufgeschwindigkeiten, äußere Traumata, einmalige anormale Bewegungen (z.B. zur Seite Springen als Fluchtreaktion oder Ausrutschen auf glattem Untergrund) und chronische Überbeanspruchung. Die forcierte Ausbildung junger Pferde, nicht entsprechend ihrem körperlichen Entwicklungszustand, kann auch zu derartigen Erkrankungen führen (Ueltschi 1989). Bei jungen heranwachsenden Pferden kann es zu einem Missverhältnis zwischen Körpergewicht und Sehnenfestigkeit kommen, woraus eine erhöhte Belastung der

Sehnen und Bänder resultiert. Oft fügt sich dieser Situation noch eine mangelnde Koordination des Bewegungsablaufes hinzu (Mc Ilwraith 1989).

Auch die Ermüdung der Muskeln der oberflächlichen und tiefen Beugesehne kann eine vermehrte Belastung des Fesselträgers nach sich ziehen. Prädisponierende Faktoren können dabei Stellungsanomalien der Gliedmaßen, Hufimbancen und unpassender Hufbeslag (zu kurze Hufeisenschenkel) sein (Schneider 2006). Pferde mit geradem Sprunggelenk oder einer Hyperextension des Fesselgelenks (weich gefesselte Pferde) werden ebenfalls als prädisponiert für Fesselträger Desmitiden angesehen (Dyson et al 2002). Im Bereich des Hufes können zu lange Zehen in Kombination mit niedrigen Trachten zu einer sekundären Veränderung der Stellung des Fesselgelenks führen. Das Gelenk gerät dabei vermehrt in Hyperextension. Stellungsanomalien der distalen Gliedmaßen des Pferdes verursachen meist eine ungleiche Belastung der Gelenke und Bänder (Dyson u. Genovese 2002, Smith et al. 2002). Bei einer bodenengen Stellung kommt es z.B. zu einer Mehrbelastung der lateralen Portion des Fesselträgers (Kainer 1989). Auch die Arbeit in tiefem, schlammigem Boden beansprucht die Sehnen des Pferdes vermehrt (Perkins et al. 2005).

Zusammenfassend tragen meist viele unterschiedliche Faktoren zur Erkrankung des Musculus interosseus medius bei. Eine gesonderte Rolle jedoch spielt die Entstehung der Degenerativen Desmitis des M. interosseus medius (DSLDD). Bei dieser Form der Erkrankung wird eine vererbliche Komponente angenommen. Sie tritt vermehrt in einzelnen familiären Linien auf (Halper et al. 2006, Hayes 1994, Young 1993).

3.2 Pathogenese und Pathophysiologie der Erkrankung des Fesselträgers

Bei der einmaligen oder wiederholten Überschreitung der Dehnungsgrenze des Fesselträgers kann es zu unterschiedlichen Pathologien kommen. Angefangen von einer subklinischen Schädigung ohne Zerreißung von Kollagenfibrillen in Form von einer Entzündung und Einblutung bis hin zur Ruptur einzelner Kollagenfibrillen, größerer Areale oder der vollständigen Durchtrennung der jeweiligen Struktur. Auch die Ansammlung von Mikroläsionen kann in einem zweiten Schritt zu einem größeren Defekt führen (Goodship et al. 1994). Viele Autoren sind der Meinung, dass Verletzungen des Musculus interosseus medius in den meisten Fällen Ursache einer

Akkumulation degenerativer Mikrotraumen sind (Goodship et al. 1994, Platt u. Wilson 1994). Von einem anderen Standpunkt aus betrachtet kommt es in dem Moment zu einer Erkrankung in dem der Austausch von Kollagenfibrillen, welcher sich permanent in vielen Formen von Gewebe dem sog. „turn-over“ vollzieht, gestört ist. D.h. es gehen mehr Kollagenfibrillen durch Überlastung oder Degeneration zugrunde, als neu gebildet werden (Patterson-Kane et al. 2012).

Symptome allgemein:

Die klinische Erscheinung der Erkrankung des Fesselträgers hängt vom Schweregrad der Läsion und von der Lokalisation ab. Bei akuten Erkrankungen werden Schwellungen, Wärme sowie Palpationsschmerz beobachtet. Hinzu kommen Lahmheiten unterschiedlichen Grades. Die Lahmheit kann durch eine tiefe Palpation, oder durch vermehrte Zugbelastung verschlimmert werden z.B. in Form von Aufheben der kontralateralen Gliedmaße. Bei chronischen Erkrankungen kann teilweise adspektorisch und palpatorisch kein Indiz auf eine Erkrankung vorgefunden werden. Einzig eine geringgradige Lahmheit ist vorhanden, die sich in manchen Fällen lediglich unter dem Reiter zeigt (Mc Ilwraith 1989, Schneider 2006).

3.3 Formen der Erkrankung des Fesselträgers

Fesselträgererkrankungen können aufgrund ihrer anatomischen Lokalisation und Ätiologie in 5 Gruppen eingeteilt werden (Dyson u. Genovese 2002, Dyson et al. 1995, Hauser et al. 1984, Rijkenhuizen et al. 2007):

- 1) Insetionsdesmopathie des Fesselträgerursprungs oder der Fesselträgerschenkel
- 2) Desmitis des proximalen Fesselträgers (proximal suspensory desmitis)
- 3) Desmitis des Fesselträgers im mittleren Drittel (midbody lesions)
- 4) Desmitis der Fesselträgerschenkel (branch lesions)
- 5) Degenerative Desmitis des M. Interosseus medius (DSLDD = Degenerative suspensory ligament desmitis)

3.3.1 Insertionsdesmopathie

Die Insertionsdesmopathie des Fesselträgers beschreibt eine inkomplette Ruptur der im Knochen verankerten kollagenen Fasern (Dämmrich 1991). Sie geht in akuten Stadien mit einer unterschiedlich deutlichen Lahmheit und einem Palpationsschmerz einher. Die Lahmheit verschlechtert sich auf weichem Boden im Vergleich zu hartem Boden. Auf dem Zirkel an der Longe forciert man sie indem das erkrankte Bein auf der Außenhand geführt wird. Bei chronischen Veränderungen ist der palpatorisch wahrgenommen Schmerz wesentlich geringer (Rantanen, 1993). Infolge von Traumata der Regionen der Insertion des Fesselträgers kann es zu Ausrissen der knöchernen Struktur kommen. Diese Avulsionsfrakturen gehen mit einer Desmitis des proximalen Fesselträgers einher (Urhahne 2005).

Avulsionsfrakturen lassen sich durch eine Röntgenaufnahmen des Bereiches des proximalen Röhrbeins und der angrenzenden Gelenkreihen des Karpus oder Tarsus verifizieren. Abgesehen von frakturierten Elementen können bei chronischer Insertionsdesmopathie eine Verdichtung der Knochenstruktur und periostale Proliferationen im Bereich des Fesselträgerursprungs beobachtet werden (Stashak 1989).

Auch knöcherne Veränderungen der Gleichbeine (Sesamoidose) in Zusammenhang mit einer entzündlichen Reaktion durch Erkrankung der Ansatzstellen der Fesselträgerschenkel an der abaxialen Fläche können röntgenologisch dargestellt werden.

3.3.2 Desmitis des proximalen M. interosseus medius (PSD)

Das klinische Bild der proximalen Desmitis des Fesselträgers zeigt, ähnlich der Insertionsdesmopathie, eine unterschiedlich ausgeprägte Lahmheit in Kombination mit Palpationsschmerz in akuten Stadien. Die Lahmheit verschlechtert sich ebenfalls auf weichem Boden und an der Longe. Wird das erkrankte Bein dabei außen geführt, zeigt es eine verkürzte kraniale Vorführphase. Dieses Phänomen kann auch teilweise im Schritt beobachtet werden (Dyson u. Genovese 2002, Lischer et al. 2006).

Die Lahmheit kann diskontinuierlich sein und durch längere Ruhephasen ganz verschwinden (Lischer et al. 2006).

Die Erkrankung kann ein-, oder beidseits an den Hinter-, oder Vordergliedmaßen auftreten. Betroffen sind vorwiegend die Vordergliedmaße, bei Warmblutpferden – speziell bei Dressurpferden höherer Klassen- sind die Schäden aber auch vermehrt in den Hintergliedmaßen zu finden. (Colahan et al. 1999, Dyson u. Genovese 2002). Proximale Desmitiden des Fesselträgers der Hintergliedmaßen sind häufig chronischer Art und zeigen lediglich eine unter dem Reiter erkennbare Lahmheit oder verringerte Leistungsfähigkeit in Form von gehemmten Bewegungen der Hintergliedmaßen. Diese Lahmheit bleibt meist trotz Boxenruhe bestehen (Dyson et al. 1995). Die anhaltende Schmerzhaftigkeit der PSD der Hintergliedmaße wird vermutlich auf ein Kompartmentsyndrom zurückzuführen sein. Dabei umschließt die starke Fascia plantaris den proximalen Teil des Fesselträgers, indem sie sich straff gespannt an den beiden Griffelbeinen anheftet (Lempe 2007, Lischer et al. 2006, Wissdorf et al. 2002). Bei der entzündlich bedingten Umfangsvermehrung des M. interosseus medius kommt es schließlich zu einem Druckschmerz durch Reizung der dort verlaufenden Nerven.

Aufgrund der häufigen Chronizität der PSD der Hintergliedmaßen lassen sich dort auch in fortgeschrittenen Stadien dystrophische Verkalkungen vorfinden (Lischer et al. 2006). Auch an der Vordergliedmaße können derartige Veränderungen auftreten, jedoch deutlich weniger häufig als an der Hintergliedmaße. Dies spiegelt die damit verbundene, beobachtete schlechtere Prognose und Heilungstendenz der PSD der Hintergliedmaße im Vergleich zur Vordergliedmaße wieder (Dyson et al. 1995).

3.3.3 Desmitis des Fesselträgers im mittleren Bereich (Body lesions)

Die Desmitis des mittleren Drittels des M. interosseus medius wird generell seltener beobachtet als eine Erkrankung des Ursprungs oder der Schenkel. Häufig treten body lesions in Zusammenhang mit angrenzenden pathologischen Prozessen auf. Dies können Griffelbeinfrakturen oder proliferative periostale Erkrankungen (knöcherne Überbeine) oder Erkrankungen der Fesselträgerschenkel sein (Dyson u. Genovese 2002, Dyson et al. 1995, Moyer u. Raker 1980). Die klinische Erscheinung der Desmitis des M. interosseus Körpers geht in der Regel mit einer deutlicheren Wärme, Schwellung und Schmerzhaftigkeit einher als bei der PSD. Dieser Abschnitt

des Fesselträgers ist im Vergleich zu seinem Ursprung palpatorisch besser zugänglich. Die Lahmheit variiert in der Regel von undeutlich geringgradig bis mittelgradig (Rijkenhuizen et al. 2007). Laut Dyson u. Genovese (2002) besteht ein geringer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Schadens und dem Grad der Lahmheit. Außerdem ließ sich eine relativ hohe Rezidivrate bei dieser Form der Erkrankung an der selben, oder der bilateralen Gliedmaße, feststellen (Dyson u. Genovese 2002).

3.3.4 Desmitis der Fesselträgerschenkel (Branch lesions)

Bei der Desmitis der Fesselträgerschenkel unterscheidet man zwischen einer einseitigen oder beidseitigen Schenkeldesmitis des M. interosseus medius. Sie treten relativ häufig bei allen Arten von Sportpferden auf (Dyson u. Genovese 2002, Moyer u. Raker 1980). In der Regel sind klinischen Erscheinungen einer akuten Erkrankung, wie Wärme Schwellung und Schmerzhaftigkeit gut zu palpieren. In chronische Fällen findet sich meist keine Schmerzhaftigkeit und Wärme der betroffene Schenkel ist jedoch derb umfangsvermehrt (Dyson et al. 2005). Der Lahmheitsgrad kann wiederum stark variieren von geringgradig bis sehr hochgradig (Rijkenhuizen et al. 2007). Anders als bei den body lesions ist die Lahmheit jedoch meist proportional zu dem vorhandenen Schaden (Dyson et al. 1995, Dyson et al. 2002). Wie auch bereits beschrieben verschlechtert sich die Lahmheit auf weichem Boden (Moyer et al. 1980). Dyson u. Genovese (2002) beobachteten bei jüngeren Pferden eine andauernde geringgradige Lahmheit, bedingt durch die permanent fortschreitende Dehnung des betroffenen Schenkels durch Hyperextension des Fesselgelenks. In diesem Zusammenhang kommt es auch häufig zur Ausbildung einer periligamentösen Fibrose. Eine schlechte Prognose wird Erkrankungen mit fibrinöser Adhäsion der Schenkel der Hintergliedmaße an umgebende Strukturen und bei Auftreten von dystrophischen Verkalkungen zugesprochen (Dyson et al. 1995, Dyson u. Genovese 2002).

Weitaus schwerwiegender als Desmitiden kann der Fesseltrageapparat auch traumatische Rupturen seines Körpers oder seiner Schenkel erleiden. Diese sind meist Folge von extremer Hyperextension (Dorsoflexion) des Fesselgelenks. Belastungen dieses Ausmaßes treten vor allem beim Pferderennen oder Springen

(v.a. Steeplechase) auf. Dabei können der M. interosseus medius oder die distalen Gleichbeinbänder rupturieren. Auch Transversalfrakturen beider Gleichbeine können unter diesen Umständen auftreten.

Die Prognose dieser Pferde ist ungünstig bis infaust. Es lässt sich im Allgemeinen lediglich eine Tauglichkeit als Zuchtstute oder Weidepferd wieder herstellen (Mc Ilwraith 1989). Erkrankungen dieser Art sind selten und wurden in unserer Studie nicht mit aufgenommen.

Desmitiden des M. interossues medius können entweder isoliert oder in Zusammenhang mit der Erkrankung angrenzender Strukturen auftreten.

Dabei kommen sie vergesellschaftet mit traumatisch bedingten Periostitiden des Röhrbeins, Gleichbein-, oder Griffelbeinfrakturen vor. Häufig kommt es im Laufe der Heilung dieser Erkrankungen durch den gebildeten Kallus zu einer mechanischen Irritation des M. interosseus medius (Mc Ilwraith, 1989).

3.3.5 Degenerative Desmitis des M. interosseus medius (DSLDD = Degenerative Suspensory Ligament Desmitis)

Degenerative Veränderungen sind im Allgemeinen bei älteren Pferden jeder Rasse anzutreffen. Aufgrund des gehäuften Auftretens innerhalb familiärer Linien jüngerer Pferde wird jedoch eine hereditäre Komponente vermutet (Halper et al. 2006, Hayes 1994, Young 1993). Besonders betroffen sind dabei Pferde der spanische Rasse Peruvian Paso, sowie Kreuzungen mit dieser Rasse. Auch Pferde der Rassen Araber, American Saddlebred und American Quarterhorse sind vermehrt betroffen (Young 1993). Bei Erkrankung entwickeln diese Pferde eine bilaterale oder quadrilaterale Lahmheit. Häufig ist diese Lahmheit persistierend und wird aus diesem Grund erst spät bemerkt. Halper et al. (2006) untersuchte in einer Studie insgesamt 28 betroffenen Pferde. 19 Pferde zeigten eine Lahmheit auf allen vier Gliedmaßen 9 Pferde auf bilateralen Gliedmaßen. Es bestand keine Relation zwischen dem klinischen Bild und dem Ausmaß der Läsion. Während der klinischen Untersuchung fiel eine derbe Umfangsvermehrung des gesamten M. interosseus medius oder einzelner Abschnitte auf. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde belegt, dass es sich um eine systemische Erkrankung handelt, welche viele Gewebe und Organe betrifft. Veränderungen im Kollagengewebe traten neben dem

Fesselträger in den Beugesehnen, den Kniebändern, im Nackenband, im Herzgefäßsystem und in den Skleren auf. Die Untersuchungen zeigten einen vermehrten Gehalt an Kollagenfibrillen mit kleinerem Durchmesser im Vergleich zu gesundem Sehnengewebe. Auch ein deutlich größeres Vorkommen an Proteoglykanen wurde bei betroffenen Tieren festgestellt. Halper et al. (2006) gehen davon aus, dass der hohe Gehalt an Proteoglykanen mit teils abnorm synthetisierten Komponenten (fehlerhaft sulfatiertes Decorin) als primäre Ursache der Veränderungen anzusehen ist.

Ein verantwortliches DSLD-Gen wurde bis heute nicht entdeckt.

Die Prognose der Erkrankung ist durch den fortschreitenden Prozess als schlecht anzusehen (Young 1993).

4. Heilung

Die Heilung von erkranktem Sehnengewebe unterteilt sich in 3 Phasen (Buck 2003, Stashak 1989):

Exsudative Entzündungsphase, Hämostasis (10 Tage):

Initial kommt es nach der Zerreißung von intaktem Sehnengewebe zu Einblutungen und zur Entstehung eines fibrinhaltigen Blutgerinnsels am Ort des Defektes. Durch die Aktivierung der Entzündungskaskade wird die Läsion mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen infiltriert. Debridement des geschädigten Gewebes in Form von Phagozytose beginnt. Eine ödematöse Schwellung lässt sich klinisch erkennen, in Kombination mit Wärme und Palpationsschmerz.

Proliferative Phase (4-45 Tage):

Im Laufe der proliferativen Phase kommt es zur Resorption des Hämatoms und zur Bildung frischen Granulationsgewebes.

Die Entzündungszellen werden durch kleine Blutgefäße und migrierte Fibroblasten ersetzt. Während dieser Phase wird die vermehrte Neubildung von Kollagenfibrillen beobachtet. Um den 45. Tag der Heilung kommt es zu einem Gleichstand der fibrillären Neubildung und des Abbaus des geschädigten Kollagens (Stashak 1989). Das neu synthetisierte Kollagen ist sowohl vom Typ I als auch bis zu 30% vom Typ III (Dahlgren et al. 2005, Silver et al. 1983, Williams et al. 1980). Die Gen-, und Proteinexpression des Typ III Kollagens konzentriert sich auf das Endotenon in den ersten 1-2 Wochen der proliferativen Phase. Bei der Untersuchung des Heilungsverlaufs von Kollagenase-induzierten Läsionen der oberflächlichen Beugesehne des Pferdes wurde eine deutliche Hypertrophie des Endotenons aufgrund der Proliferation von vaskulären und fibroblastischen Strukturen beschrieben (Patterson-Kane et al. 2012, Silver et al. 1983). Daraufgehend verteilt sich die Typ III Kollagen Synthese, wie auch die Typ I Synthese diffus (Dahlgren et al. 2005). Andere Autoren aus der Humanmedizin beschreiben, dass zunächst die Produktion von Kollagen Typ III überwiegt und ihr Maximum in der proliferativen Phase erreicht. Danach kommt es aber zu einer rückläufigen Bildung des Kollagen Typ III und die Synthese von Kollagen Typ I überwiegt (Freeman u. Silver 2005,

Sasaki u. Odajima 1996, Urschel et al. 1988). In frühen Stadien der Heilung weist das beschädigte Sehnengewebe eine gelatineartige Konsistenz auf. Es beinhaltet vereinzelte dünne Kollagenfasern und einen erhöhten Gehalt an Wasser, Fibronectin und Glykosaminoglykanen (Dahlgren et al. 2005, Williams et al. 1984a u. 1984b). Es gibt noch wenig Information über die Rolle von Wachstumsfaktoren, ihren Rezeptoren und Zytokinen im Verlauf von Sehnenheilung (Patterson-Kane et al. 2012). Bei der Darstellung der verschiedenen Therapien der Fesselträgererkrankungen wird auf diesen Aspekt noch genauer eingegangen.

Maturation/Reifungsphase: 45.-120.Tag:

In der Reifephase kommt es zu einer Ausrichtung der Fibroblasten und Kollagenfibrillen in Längsrichtung. Die Fibrillendichte nimmt mit Fortschreiten der Reifephase zu, ebenso wie das Auftreten dickerer Kollagenfibrillen (Buck 2003). Dies geschieht neben der Neusynthese dicker Fibrillen auch durch Umbauprozesse von Typ III Kollagen in Typ I Kollagen. Die typische wellenförmige Aneinanderlagerung der Kollagenfasern (crimp pattern) kann wieder beobachtet werden (Williams et al. 1984b). Zwar kommt es nach einem durchschnittlichen Zeitraum von sechs Monaten zur einer wiederhergestellten Morphologie ähnlich dem normalen Sehnengewebe, es bleibt jedoch fortlaufend ein Narbengewebe erhalten (Smith et al. 2002, Stashak 1989). Nach bis zu 14 Monaten Heilung kann zum Teil noch ein erheblicher Anteil kleiner Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser unter 80nm beobachtet werden (Becker et al. 2001, Goodship et al. 1994, Oberbeck 1992). Dieses Ersatzgewebe unterliegt funktionell dem gesunden Sehnengewebe. Es ist insgesamt weniger belastbar und weniger elastisch (Smith et al. 2002). Viele Autoren bezweifeln die Möglichkeit der vollständigen funktionellen Rekonstruktion einer erkrankten Sehne (Goodship 1993, Möller et al. 2000, Webbon 1973). Auch kommt es im Zusammenspiel von Narbengewebe und intakter Sehne zu funktionalen Störungen (Goodship et al. 1994). Weitere fortschreitende Komplikationen der Narbenheilung sind peritendinöse Fibrosen und Adhäsionen sowie verknorpelte oder verkalkte Bereiche (Webbon 1973). Aufgrund der veränderten Eigenschaften ist die Gefahr einer Rezidivierung entsprechend hoch. Dafür verantwortlich scheint zum einen die verringerte Elastizität des straffen Narbengewebes, zum anderen der hohe Anteil an Kollagenfasern mit kleinem Durchmesser, bzw. der verringerte Anteil dicker Fasern zu sein (Parry et al. 1987a, Schneider 2006).

Parry et al. (1987a) haben festgestellt, dass die mechanischen Möglichkeiten von Sehnen in Zusammenhang mit dem Durchmesser ihrer Kollagenfibrillen stehen. Dicke Fibrillen mit einem großen Durchmesser können größeren Kräften standhalten als dünne Fibrillen.

Betrachtet man die Sehne im Ganzen nach einer Schädigung und im Verlauf der Heilung auf makroskopischer Ebene erscheint diese insgesamt dicker als eine gesunde Sehne. Becker (1996) untersuchte die Heilung des Unterstützungsbandes der tiefen Beugesehne des Pferdes nach Desmotomie. Die Beurteilung erfolgte 6 Monate nach dem Eingriff. Als Referenz diente die kontralaterale Gliedmaße. Das Unterstützungsband zeigte nach Desmotomie eine um den Faktor 3 vergrößerte Querschnittsfläche (CSA= cross sectional area) im Vergleich zu dem gesunden Band. Die Zunahme der Dicke der Sehne wird als Kompensation der reduzierten mechanischen Funktion des Narbengewebes betrachtet (Becker 1996).

Die Heilung der Beugesehnen des Pferdes wurde auf ultrastruktureller Ebene bereits von Buck (2003) untersucht. Dabei wurden von an Tendopathien und Desmitiden erkrankten Pferden Sehnengewebe durch Feinnadelbiopsie entnommen und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Fibrillenstruktur der Gewebeproben wurde durch eine Scorebewertung erfasst und mit Referenzstrukturen gesunder euthanasierter Pferde ähnlichen Alters verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass ein, für die Belastung als Reitpferd funktionell ausreichendes Narbengewebe zwar wieder von dicken Fibrillen dominiert wird, aber in Bezug auf die fibrilläre Anordnung, Dichte, Linearität und Parallelität der Fibrillen signifikant von der fibrillären Organisation von gesundem Sehnengewebe abweicht. Diese Beobachtungen sind bei weit fortgeschrittener und abgeschlossener Heilung zu beobachten. Der Autor kommt zu dem Fazit, dass die Bildung des Narbenkollagen maximal eine restitutio ad functionem der Sehnenläsion darstellt (Buck 2003).

5. Therapie

Die Therapie der Erkrankung des Fesselträgers stellt aufgrund der langwierigen und inkompletten Heilung eine große Herausforderung dar. Die initiale Therapie einer akuten Desmitis ist zunächst die Ruhigstellung in Kombination mit einer entzündungshemmenden Medikation. Dabei werden NSAIDs systemisch über 7-10 Tage angewandt. Lokal kann durch eine einmalige periläsionale Injektion mit Kortison eine übermäßige Bildung von Granulationsgewebe und eine Adhäsion an angrenzende Strukturen unterbunden werden (Mc Ilwraith 1989). Zudem kann die betroffenen Gliedmaße durch kaltes Abduschen oder das Anlegen kühlender Verbände gekühlt werden um die Blutung und Ödembildung zu begrenzen. Nach 3-4 Tagen Kältetherapie sollte auf Wärmeapplikation umgestiegen, werden um Durchblutung zu verbessern und die Resorption anzuregen (Schneider 2006). Im weiteren Heilungsverlauf ist auf ein kontrolliertes Bewegungsprogramm zu achten. Die regelmäßige Verfolgung des Heilungsverlaufs durch Kontrolluntersuchungen ist ebenfalls anzuraten (Gillis 1997, Mc Ilwraith, 1989, Stashak 1989).

Fortlaufend werden neue Ansatzmöglichkeiten erforscht um die Bildung eines gleichwertigen Gewebes anstatt eines narbenartigen Ersatzgewebes im Verlauf der Heilung von Sehnen zu erzielen. Die Methode der Therapie mittels Zellen, biologischen Faktoren und Biomaterialien wird als Tissue Engineering bezeichnet. Ziel der regenerativen Therapien ist es die normale Gewebestruktur und Funktion des erkrankten Gewebes wieder herzustellen (Kall u. Nöth 2004, Koch et al. 2009). Im Verlauf der vorangegangenen klinischen Studie wurden zwei Formen der regenerativen Therapien angewandt. Diese werden in Folgendem näher beschrieben.

5.1 Adulte Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Bei den in der Therapie von Sehnenschäden verwendeten adulten mesenchymalen Stammzellen (MSC) handelt es sich um multipotente Zellen. Sie besitzen die Möglichkeit der weiteren Differenzierung in verschiedene mesodermale Zelllinien wie Osteoblasten, Chondrozyten, Tenozyten, Adipozyten und Muskelzellen (Arnhold et al. 2007, Fortier u. Smith 2008, Taylor et al. 2007). Im Gegensatz zu totipotenten

frühembryonalen und pluripotenten spätembryonalen Stammzellen können sich adulte Stammzellen nur noch innerhalb der Zelllinien ihres Ursprungs-Keimblattes differenzieren (Koch et al. 2008). Mesenchymale Stammzellen finden sich in allen Geweben des Körpers in sehr geringer Konzentration. Sie sind für den permanenten Ersatz und die Regeneration der Zellen im Körper aller Lebewesen, nach Ablauf ihrer natürlichen Lebenszeitspanne, zuständig (Caplan u. Dennis 2006, Caplan 2007). Der Begriff der mesenchymalen Stammzellen hat sich weit verbreitet und in der tiermedizinische Literatur weitläufig durchgesetzt (Del Bue et al. 2008, Herthel 2001, Herthel 2003, Smith et al. 2003, Taylor et al. 2007). Die ursprüngliche Bezeichnung der multipotenten mesenchymalen Stromazelle von Friedenstein et al. (1976) entspricht nach Meinung einiger Autoren der korrekten Bezeichnung der verwendeten Zellen (Burk et al. 2011, Horwitz et al. 2005, Roggel 2013). Guest et al. (2010) übertrug, wie auch anderen Autoren, in ihrer Einleitung den Begriff der mesenchymalen Stromazelle 1:1 auf den gängigen Begriff der mesenchymalen Stammzelle. Sowohl für die mesenchymale Stromazelle, als auch für die mesenchymale Stammzelle wird das Akronym „MSC“ verwendet (Roggel 2013).

Die Fähigkeit der in Sehnendefekte implantierten MSC sich in vivo in funktionelle Tendozyten zu differenzieren ist noch ungewiss. Es liegen jedoch eindeutige Hinweise auf eine tenogene Differenzierung in vitro vor (Arnhold et al. 2007, Colleoni et al. 2009, Raabe et al. 2013). Durch die Produktion bioaktiver Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren (TGF- β , VEGF und HGF), Zytokinen und Interleukinen erlangen Stammzellen verschiedene Wirkmechanismen (Rehman et al. 2004, Caplan 2007, Sorell et al. 2009, Richardsdon et al 2007, Taylor et al. 2007). Sie begrenzen eine Vergrößerung der Läsion durch antiapoptotische Wirkung, unterdrücken die Fibroseentstehung, stimulieren die Angiogenese und erhöhen die Kollagensynthese (Caplan u. Dennis 2006, Rehmann et al. 2004, Sorell et al. 2009). Neben der besonderen Differenzierungsfähigkeit erscheinen MSC auch aus immunologischer Sicht als privilegiert. Sie exprimieren kein MHC-II Oberflächenantigen und werden demzufolge nicht als fremd erkannt (Le Blanc et al. 2003, Niemeyer et al. 2004). Weiterhin unterdrücken Stammzellen die Lymphozyten-, und T-Zell- Aktivierung und Proliferation. Hierfür scheinen wiederum sezernierte Wachstumsfaktoren (TGF- β und HGF), IL-10 und der direkte Zellkontakt verantwortlich zu sein (Di Nicola et al. 2002, Le Blanc et al. 2003, Niemeyer et al. 2004). Allogene Stammzellen rufen daher bei dem Empfängerorganismus keine erfassbare Abwehrreaktion auf (Ryan et al. 2005).

Ein beobachteter entzündungshemmender Effekt von Stammzellen in Studien kann auf die Unterdrückung der Immunantwort aber auch auf die Hemmung bestimmter Entzündungsmediatoren zurückgeführt werden (Schnabel et al. 2009). Die in der Entzündungskaskade agierenden Zytokine TNF- α und INF- γ werden von MSC gehemmt (Aggarwal u. Pittenger 2005). Auch die Sekretion von IL-10 und HGF durch MSC hat einen unmittelbaren entzündungshemmenden Effekt (Rehman et al. 2004). Die Funktionsfähigkeit und Aktivität von Stammzellen hängt von ihrem unmittelbaren Umfeld ab. Eine sogenannte Stammzellennische ist für eine Aktivierung der Zellen notwendig um sich in eine bestimmte Richtung zu entwickeln und spezifische Funktionen auszuführen. Ein geschädigtes entzündetes Gewebe mit einer hohen Stoffwechselaktivität und die Anwesenheit von Zellmediatoren stellen vermutlich eine die passenden Signale übermittelnde Nische dar (Koch et al. 2009). Das Verbringen einer großen Anzahl von MSC in eine Sehnenläsion hat demzufolge das Ziel durch direkte Differenzierung der MSC zu Tendozyten und Fibroblasten den Zellgehalt und die Kollagensynthese zu erhöhen und die entzündlichen Prozesse zu hemmen.

Die Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen kann aus verschiedenen Quellen im Körper erfolgen. Am häufigsten wird jedoch für die Gewinnung das Knochenmark des Sternums oder der Tuber coxae verwendet. Für die Gewinnung von Stammzellen aus Fettgewebe wird das subkutane Fettgewebe im Bereich der Glutäen-Muskulatur aus der Gegend des Schweifansatzes herangezogen (Colleoni et al. 2009, Roggel 2013). Am Pferd wurde die Kultivierung von Mesenchymalen Stammzellen nach Isolation bereits erfolgreich durchgeführt (Arnhold et al. 2007). Die Anwendung von Stammzellen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die Stammzellen können entweder direkt am Anwendertier gewonnen und unmittelbar in den zu therapierenden Defekt injiziert werden (Herthel et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit bildet die in vitro Vermehrung der entnommenen Stammzellen des Individuums vor Injektion. Nachteil dabei ist jedoch der Verzögerungsfaktor des Therapiebeginns um 2-6 Wochen (Fortier u. Travis 2011). Eine in vitro Anzüchtung der Zellen über 14-16 Tage zeigt eine Vervielfachung der Zellen um den Faktor 2-20 (Smith et al. 2003). Als weitere therapeutische Anwendung der MSC bleibt die allogene Zelltransplantation. Dabei werden die Zellen von einem Fremdtier gleicher Spezies gewonnen und kulturell expandiert. Durch Kryokonservierung haltbar gemacht können diese Zellen nun bei Bedarf aufgetaut und injiziert werden (Arnhold et al. 2007, Colleoni et al. 2009, Del Bue et al. 2008). Die Konservierung der Zellen

kann bis zu 6 Monate vollzogen werden. Nach dem Auftauen der Zellen ließ sich der Erhalt der Proliferations-, und Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen weiterhin nachweisen (Arnhnold et al. 2007). Auch Goletz (2009) untersuchte 1,5 Jahre alte kryokonservierte equine MSC. Nach dieser Zeit überlebten 88,68% der Zellen und zeigten keinerlei Abweichungen in ihrer Morphologie und ihrem Proliferationsverhalten. Die lokale Injektion allogener MSC ruft beim Pferd keine erkennbare zelluläre Immunantwort und keine Anzeichen von Entzündung auf histologischer Ebenen betrachtet hervor. Dies zeigten Untersuchungen der mit allogenen und autologen MSC therapierten OBS im direkten Vergleich durch Guest et al. (2008).

Der optimale Zeitpunkt der Implantation der MSC im Verlauf der Therapie und die Menge an injizierten Zellen sind noch nicht hinreichend wissenschaftlich untersucht (Dahlgren 2009, Koch et al. 2009). In der Literatur werden Dosen zwischen mindestens 1×10^6 (Pacini et al. 2007), 6×10^6 (Brehm 2008), 1×10^7 (Burk et al. 2011, Taylor et al. 2007) und 5×10^7 (Richardson et al. 2007) beschrieben. Als optimaler Zeitpunkt wird ein Zeitfenster von 2 Wochen nach Abklingen der akuten Entzündungsphase ca. 1 Woche nach dem Trauma bis ca. 3 Wochen nach Erkrankung beschrieben. Andere Autoren siedeln das Therapiefenster deutlich später an im Zeitraum von einem bis zu drei Monate nach Erkrankung. Ein gut entwickeltes Granulationsgewebe optimiert das Überleben der implantierten Zellen (Smith und Webbon 2005). Nach Einsetzen der Bildung von unelastischem Narbengewebe erscheint eine Behandlung weniger sinnvoll (Fortier u. Smith 2008).

Erste Untersuchungen der Anwendung von Stammzellen im Verlauf von Sehnenheilung wurden am Kaninchen durchgeführt. Awad et al. (1999) verwendete autologe kultivierte MSC um die Heilung von Schnitteinzisionen an der Patellarsehne zu untersuchen. Als Placebo wurde zellfreies Kollagengel verwendet. Nach 4 Wochen ergab sich bei den mit Stammzellen therapierten Sehnen eine signifikant höhere biomechanische Festigkeit in Bezug auf Dehnungsenergie und Zerreißkraft. Auf histologischer Ebene ließen sich jedoch keine Unterschiede der beiden Behandlungen feststellen. Young et al. (1998) injizierte MSC in einen 1cm langen Defekt der Achillessehne von Kaninchen. Seine Untersuchungen nach 12 Wochen ergaben die Regeneration eines Sehnen-ähnlichen Gewebes.

Die erste umfangreiche Studie zur Therapie des Fesselträgers mit MSC wurde von Herthel et al. (2001) durchgeführt. Dabei wurden 100 Pferden mit diagnostiziertem Fesselträger-Schaden (akut oder chronisch) 6ml Knochenmarkaspirat aus dem Sternum entnommen und direkt in die Läsion des M. interosseus medius injiziert. Die Kontrolluntersuchungen in den darauffolgenden Monaten beinhalteten eine klinische und eine sonographische Untersuchung. Nach 6 Monaten waren 84 Pferde wieder voll in sportlichem Einsatz. Das Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung der Autoren dass mit Hilfe der vollzogenen Therapie eine bessere Heilung erzielt wurde und eine geringere Rezidivrate als bei anderen Therapien erzielt werden konnte. Insgesamt waren 91% der Pferde wieder auf vorangegangenen Leistungslevel einsetzbar. Die Vergleichsgruppe dieser Studie stellte eine Population von 66 erkrankten Pferden dar welche nicht mit MSC therapiert wurde. Von ihnen waren 84,8% nach einem Jahr noch nicht lahmfrei oder erlitten ein Rezidiv.

Eine ähnliche Studie wurde von Rosenbrock et al. (2004) durchgeführt. Dabei wurde 24 Pferden mit einer bestehenden Fesselträgererkrankung natives, autologes Knochenmark intraläsional injiziert. Nach 6 Monaten waren 75% der Pferde wieder in vollem Training, ein Pferd zeigte nach 6 Monaten ein Rezidiv, zwei Pferde zeigten eine unveränderte Lahmheit.

Smith et al. (2003) verwendete erstmals kultivierte autologe Stammzellen, gewonnen aus dem Knochenmark. Ein 11-jähriges Polo-Pony wurde 5 Wochen nach einer spontanen Verletzung der OBS intraläsional therapiert. Nach einer 4-wöchigen Kultivierung wurde eine Menge von 2×10^6 Zellen injiziert. Es zeigte sich keine unerwünschten Nebenwirkungen 10 Tage oder auch 6 Wochen nach Injektion.

Die meisten Studien zur regenerativen Therapie beim Pferd befassen sich mit der Heilung der oberflächlichen Beugesehne (OBS). Corvace et al. (2007) schuf in seiner Studie Kollagenase-induzierte Core-Läsionen in der OBS. Es wurden insgesamt 6 Hengste gleicher Rasse und gleichen Alters ohne Vorerkrankungen der Sehne verwendet. Ihnen wurde an je 3 Gliedmaßen ein Sehnenschaden gesetzt und gleichzeitig Knochenmark am Tuber coxae entnommen. Nach 3-wöchiger Kultivierung der Stammzellen wurden die Defekte randomisiert mit den kultivierten Stammzellen (cMSCs), mononuklearen Zellen aus dem Knochenmark (BMMNCs), Fibrin Kleber oder isotonischer Kochsalzlösung intraläsional behandelt. Die BMMNCs wurden am Tag der Injektion aus dem Knochenmark (Tuber coxae) gewonnen und durch Zentrifugation isoliert und konzentriert. Die verwendeten

Zellmengen und Injektionsvolumina betrugen: cMSCs: $5,5 \times 10^6$, in $4,2 \pm 2,3$ ml Fibrinkleber, BMMNCs: $122,3 \pm 23,1 \times 10^6$ in $2,0 \pm 0,5$ ml Fibrinkleber.

Die wöchentlichen sonographischen Untersuchungen zeigten bis zur 6. Woche keinen Unterschied zwischen den Therapiegruppen. Ab der 16. Woche bis hin zur 21. Woche zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den zelltherapierten Gliedmaßen und den Placebogruppen (Fibrinkleber oder Kochsalzlösung). In der post mortalen histologischen und immunhistochemischen Untersuchung zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Der Gehalt an Kollagen Typ III, COMP und CD34+ (stammzellspezifischer Oberflächenmarker) war deutlich vermehrt in den beiden regenerativen Therapiegruppen. Die reparierte Sehne wies bezüglich der Fibrillenkonstruktion und Fibrillenordnung und der Kollagen Typ I/ Typ III – Verteilungsrate keine Unterschied gegenüber intaktem Sehnengewebe auf. Bei den Placebogruppen zeigte sich ein dominanter Gehalt an Typ III Kollagen und die Fibrillenordnung war nicht parallel (Corvace et al. 2007).

Eine ähnliche Studie wurde von de Mattos Carvalho et al. (2011) durchgeführt. Grundlage der Untersuchung war ebenfalls ein Kollagenase-induzierter Sehnenschaden der OBS beider Vordergliedmaßen junger Stuten. Eine Gliedmaße wurde 30 Tage nach Setzen der Läsion mit aus Fettgewebe gewonnenen allogenen kultivierten Stammzellen therapiert. Die sonographischen und klinischen Verlaufsuntersuchungen zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Gliedmaßen. Zur weiteren Untersuchung wurde 60 und 150 Tage nach Setzen des Schadens eine Biopsie des betroffenen Sehnenabschnittes entnommen und histologisch und immunhistochemisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten bei den stammzelltherapierten Sehnen signifikant bessere Fibrillenorganisation, verringerte Entzündungszellinfiltration, erhöhte Neovaskularisation, sowie einen erhöhten Anteil an Kollagen Typ I im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ein weiteres Modell der künstlich erzeugten Sehnenschäden ist die chirurgisch gesetzte Läsion. Roggel (2013) beschreibt in seiner Arbeit die Anwendung von mesenchymalen Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSC) als Therapie chirurgisch gesetzter Sehnenläsionen. Die Injektion der AT-MSC erfolgte 2 Wochen nach Erzeugung der Läsion. Die Verlaufsuntersuchung der Heilung wurde mit Hilfe der UTC-Technik (ultrasonographic tissue characterisation) und B-Mode Sonographie durchgeführt. Nach 24 Wochen wurden die Pferde euthanasiert, und die erkrankten Sehnenregionen wurden histologisch untersucht. Als Placebo diente das alleinige

Medium der Stammzellen, sterilisiertes autologes Serum. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen dass AT-MSC im Vergleich zu verwendeten Kontrolle weder zu einer verbesserten Qualität des gebildeten Ersatzgewebes noch zu einem beschleunigten Heilungsverlaufs führte (Roggel 2013).

Erste Studien zur allogenen Transplantation von AT-MSC führte Del Blue et al. (2008) durch. Den insgesamt 16 Versuchspferden wurden aus Fettgewebe fremder Pferde isolierte und im Labor kultivierte MSC in Kombination mit autologem PRP intraläsional injiziert. 14 der 16 Pferde kehrten nach der Behandlung zu ihrer ursprünglichen Leistung zurück, und kein Pferd zeigte Komplikationen nach der Injektion.

5.2 Platelet rich Plasma (PRP)

Platelet rich Plasma bezeichnet ein Ultrakonzentrat von Thrombozyten. Die Herstellung von PRP erfolgt durch spezielle Zentrifugation von venösem Blut nach Zugabe von Gerinnungshemmer. Verschiedene Hersteller bieten passende Sets für dieses Verfahren an (Zachos u. Bretone 2005, Pelletier et al. 2012).

Erste veröffentlichte Verwendungen von abzentrifugiertem Eigenblut findet man in der Zahnmedizin in Form von der Füllung von Zysten. Whitman et al. (1997) beschrieb erstmals die Herstellung von PRP. Er verfolgte damit das Ziel einer beschleunigten knöchernen Regeneration in der Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie. Es wurde bereits auf einen positiven Effekt von PRP hingewiesen und dieser von den Autoren den in PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren und Fibrin zugeschrieben (Whitman et al. 1997).

Der therapeutische Einsatz von PRP beruht in erster Linie auf dem hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren der Thrombozyten und ihrer in vitro bewiesenen Wirksamkeit (Chang, et al. 1997, Haupt et al. 2006, Ionita 2010, Schnabel et al. 2007). Bekannte Vertreter sind: Platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta 1 (TGF β_1), transforming growth factor beta 2 (TGF β_2), insulin like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF), epithelial cell growth factor (ECGF), hepatocytic growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (Waselau et al. 2008) und fibroblast growth factor (FGF) (Pelletier et al. 2013). Nach Aktivierung der Thrombozyten setzten diese anabole Wachstumsfaktoren aus ihren α -Granula frei. Dieser Mechanismus induziert eine positive Wirkung auf die Proliferation und

Migration von Tenozyten, stimuliert die Angiogenese und erhöht die Gen Expression von Kollagen und anderen Sehnenmatrix Komponenten (Bosch et al. 2010b, Dahlgren et al. 2001, Ionita 2010, Molloy et al. 2003, Murphy u. Dixon 1997). Eine antibakterielle Wirkung gegen Staphylococcus aureus und E.coli sowie eine analgetische Eigenschaft konnte ebenfalls beobachtet werden (Ionita 2010).

In vitro Versuche belegten frühzeitig einen positiven Effekt von PRP auf die Aktivität von Fibroblasten gewonnen aus Pferdesehnen (Haupt et al. 2006, Murphy u. Dixon 1997, Schnabel et al. 2007). Smith et al. (2006) und Schnabel et al. (2007) isolierten und kultivierten Fibroblasten aus dem Fesselträger des Pferdes. Die Kultivierung erfolgte dabei durch Zugabe verschiedener Wachstum fördernder Agenzien. Smith et al. (2006) untersuchte den Effekt von ABM, PRP, equinem Serum (ES), foetalem bovinem Serum (FBS) und dem Kulturmedium allein auf das Wachstum der Fibroblasten. Die Untersuchungen zeigten einen signifikant höheren Effekt aller Zugaben auf die Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Besonders überragend zeichnete sich jedoch ABM ab. ES und FBS unterlagen wiederum den Messergebnissen von PRP.

Schnabel et al. (2008) verglich den Effekt von PRP, PPP, Blut, Plasma und ABM in unterschiedlicher Konzentration als Zugabe des Kulturmediums von Fibroblasten. Die Stoffwechselaktivität der Einzelnen Proben wurde ermittelt durch die Bestimmung des Kollagengehalts (Typ I und III), des COMP-, und Decorin-Gehalts und der DNA- und Proteingehaltsmessung. Als Ergebnis dieser Studie zeigte sich ABM (100% Konzentration) insgesamt den anderen Substanzen überlegen. Wobei die PRP-Reihe den höchsten Kollagen-Gehalt aufwies.

Bosch et al. (2010a, 2010b, 2011) untersuchte bei 6 Pferden die Heilung von chirurgischen Inzisionen der OBS unter Zugabe von PRP und einem Placebo (Kochsalzlösung). Die Läsionen wurden 7 Tage nach Setzen des Sehnenschadens behandelt. Die Evaluierung erfolgte mit der UTC-Technik. Die Ergebnisse wurden auch mit den Daten gesunder Sehnen verglichen. Bereits in den ersten 8 Tagen nach Injektion zeigte sich in der PRP Gruppe ein geringerer Anteil an „N type pixels“. Diese messen nicht strukturelle Komponenten wie Zellen und Flüssigkeiten. Die Autoren schließen aus diesen Beobachtungen eine direkte antiinflammatorische Wirkung des PRP. Strukturkorrelierte Messwerte zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Anordnung der Fibrillen. Die Strukturneubildung (Fibrillogenese) war in den ersten 8 Wochen nach Injektion in

der PRP Gruppesignifikant höher. Über 80% der Fibrillen zeigte bei der PRP Gruppe nach 24 Wochen eine lineare Anordnung entsprechend der gesunden Sehngeweibes. In der Kontrollgruppe waren es nur 60%. Bei der histologischen Untersuchung zeigten sich ähnliche Beobachtungen.

Auf gleiche Weise wurde in einer vorangegangenen Studie die Heilung der OBS nach biomechanischen, biochemischen und histologischen Kriterien vorgegangen. Die PRP behandelten Sehnen zeigten einen deutlich höheren Kollagen-, Glykosaminoglykan-, und DNA-Gehalt als die der Placebo Gruppe. Die PRP Gruppe schnitt auch bei der biomechanischen Zerreißprobe und im elastischen Modell besser ab. Histologisch zeigte sich ähnlich der UTC-Ergebnisse der Nachfolgestudie ein besser organisiertes Kollagengewebe in Bezug auf die Fibrillenlängsorientierung (Bosch et al. 2010a, b).

6. Untersuchung und Diagnosestellung von Fesselträgererkrankungen

6.1 Klinische Untersuchung

Am Anfang jeder klinischen Untersuchung steht das ausführliche Gespräch mit dem Besitzer oder Betreuer des Pferdes. Die Anamnese ergibt wichtige Information über die gesundheitliche Vorgeschichte des Pferdes, den zeitlichen Verlauf der Erkrankung und eventuellen Traumata oder Veränderungen. Die Nutzung und der Trainingsstand des Pferdes spielen bei orthopädischen Erkrankungen immer eine wichtige Rolle.

Dem Anamnesegespräch folgt dann die klinische Untersuchung in Ruhe. Das Pferd wird ausführlich adspektorisch begutachtet. Besondere Aufmerksamkeit wird hierbei prädisponierenden Faktoren, wie z.B. Gliedmaßenfehlstellungen, dem Zustand der Hufe und des Beschlags, gewidmet.

Die Betrachtung des Pferdes in der Bewegung erfolgt zunächst im Schritt auf der Geraden und in der Wendung. Je nach Schweregrad der Lahmheit erfolgt dann die Untersuchung im Trab auf der Geraden und in der Wendung. Die Untersuchung sollte stets auf weichem und hartem Boden erfolgen. Bei undeutlichen Lahmheiten können Galopp-Trab Übergänge oder eine längere Belastung die Lahmheit verstärken. Bei bisher nur unter dem Reiter aufgefallenen Taktunreinheiten sollte man sich das Pferd bei der Lahmheitsuntersuchung zusätzlich unter dem Reiter vorstellen lassen. Im Anschluss an die Bewegung wird nun die erkrankte Gliedmaße systematisch palpatorisch untersucht. Die Palpation des M. interosseus medius erfolgt am stehenden Pferd und an angehobener Gliedmaße (Stashak 1989). Die Lahmheit verschlimmert sich meist nach der tiefen Palpation oder der Beugung der betroffenen Gliedmaße. Auch ein längeres Aufheben der kontralateralen Gliedmaße kann die Lahmheit verstärken (Mc Ilwraith 1989).

Bei undeutlichen klinischen Befunden kann die Lokalisation der Lahmheitsursache durch diagnostische Anästhesien verifiziert werden. Eine positive hohe Vierpunktanästhesie spricht für eine Erkrankung im Bereich des Metacarpus bzw.

Metatarsus. Dabei werden die Nn. palmares und die Nn. metacarpi palmares bzw. an der Hinterhand die Nn. plantares und die Nn. metatarsi palmares anästhesiert. Die Injektion wird unterhalb des Tarsus bzw. Karpus in der Rinne zwischen dem M. interosseus medius und der tiefen Beugesehne durchgeführt. Bei einer negativen Anästhesie bleibt die Möglichkeit der Erkrankung des Fesselträgerursprungs bestehen. Dieser wird durch Äste des N. metacarpi palmaris lateralis innerviert. Dieser Nerv geht auf Höhe des mittleren Karpalgelenks aus dem Ramus palmaris des N. ulnaris hervor. Somit wird er mit der hohen Vierpunktanästhesie nicht wirksam anästhesiert. Die Fesselträgerursprungs-Anästhesie erfolgt als lokale Infiltrationsanästhesie von medial und lateral durch Vorschieben der Kanüle in den Ursprung des M. interosseus medius.

Alternativ kann eine Anästhesie des N. palmaris lateralis auf Höhe des Vorderfußwurzel-Mittelgelenks, oder eine Anästhesie des N. ulnaris durchgeführt werden (Stashak 1989).

6.2 Ultrasonographische Untersuchung

Die ultrasonographische Untersuchung eignet sich sehr gut zur Festigung der Diagnose des Fesselträgerschadens. Weiter gibt sie Erkenntnis über die Lokalisation und das Ausmaß bzw. den Schweregrad der Erkrankung.

Man benötigt zur sonographischen Untersuchung des Sehnenbandapparates des Pferdes einen Linear- oder Sektorschallkopf mit einer Leistung von idealerweise 7,5MHz (Genovese et al. 1987, Rantanen 1993, Rapp 1997, Schneider 2006).

Die Ultraschalluntersuchung der betroffenen Struktur wird an der stehenden Gliedmaße durchgeführt. Die Untersuchung sollte stets den kompletten Fesselträger umfassen, um das Ausmaß des Schadens zu dokumentieren (Rapp 1997). Es wird systematisch vorgegangen und der gesamte Fesselträger sonographisch untersucht. Die Untersuchung erfolgt in zwei Ebenen: longitudinal und transversal. Dies ist notwendig, da die Untersuchung im B-Mode Schnittbilder in 2-dimensionaler Darstellung präsentiert. Insgesamt werden die gleichmäßige Echogenität, die Abgrenzbarkeit der Strukturen und im longitudinalen Echogramm die parallele Ausrichtung der Sehnenfasern beurteilt.

Bei dem Vorliegen einer akuten Desmitis des Fesselträgers sind hypoechogene bzw. anechogene Bereiche darstellbar. Dabei lassen sich Flüssigkeitsansammlungen in

Form von Ödemen und Hämatomen verifizieren. Im erkrankten Bereich fehlt die parallele Ausrichtung der Kollagenfasern durch Faserzerreißen oder Auseinanderweichen (Schneider 2006). Auch eine Umfangsvermehrung des erkrankten Gewebes kann durch eine ultrasonographische Untersuchung dargestellt und bemessen werden.

Chronische Veränderungen des Sehnengewebes gehen hingegen mit einer Verdichtung des Gewebes, in Form einer Fibrose oder Vernarbung und damit einer Erhöhung der Echogenität einher (Hauser et al. 1984).

Besonders der Fesselträger ist aufgrund seines variablen Anteils an Muskelfasern und Fettgewebe oft schwer zu beurteilen (Lischer et al. 2006). Die hypoechoischen Areale, bedingt durch Muskelfasern und Fettgewebe, dürfen nicht mit echten Läsionen verwechselt werden (Rijkenhuizen et al. 2007). Eine vergleichende Untersuchung der kontralateralen Gliedmaße kann hierbei hilfreich sein (Rapp 1997). Narbengewebe zeigt sich im Ultraschall als hyperechogener Bereiche. Kommt es zu Kalzifizierungen im Sehnengewebe, stellen sich diese stark reflektierenden Substanzen als weißer Punkt mit dahinterliegendem Schallschatten dar, ähnlich dem Bilde einer Knochengrenze wie im Falle der Gleichbeine. Auch die Kontur des knöchernen Kortex des Röhrlbeins sollte während der Untersuchung mit beurteilt werden (Lischer et al. 2006). Um die pathologischen Befunde der Untersuchung möglichst ihrer genauen Lokalisation zuzuordnen, teilten Rantanen (1986) und Genovese et al. (1986) erstmals den Metakarpus in verschiedene Zonen ein. Dabei teilt sich die Strecke zwischen dem unteren Rand des Os carpi accessorium bis weiter distal zum Fesselgelenk reichend in 6 gleiche Zonen ein (1A, 2A, 1B, 2B, 3A, 3B). An der Hintergliedmaße wird der Metatarsus in 4 gleiche Zonen eingeteilt (1A, 2A, 1B, 2B). Alternativ kann nach der Methode von Pugh (1993) vorgegangen werden. Dabei handelt es sich um eine Einteilung in Zentimeter von proximal nach distal.

Auch die Echogenität sollte möglichst präzise definiert werden, um das Ausmaß einer Läsion zu beurteilen. Die Qualität der Echogenität kann anhand von Schemata eingeteilt werden. Ein Beispiel dafür ist das Einteilungsschema von Genovese et al. (1986) und McCellan (1986). Normale Echogenität wird dabei mit 0% Ausmaß der Läsion (=Typ 0) über 4 Zwischenstufen (1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-99%) bis hin zu 100% Ausmaß (Typ V), entsprechend einer kompletten Ruptur, eingeteilt.

Die Bildinterpretation von Ultraschallbildern ist von vielen Faktoren abhängig. Es kommt immer wieder zu Artefakten, derer sich der Untersucher stets bewusst sein muss, um gegebenenfalls Fehlinterpretationen zu vermeiden (Stadtbaumer 1988). Eine optimale Vorbereitung des Patienten und die richtige Einstellung des Gerätes sind Voraussetzung. Die Untersuchung selbst und damit die Führung des Schallkopfes sind von dem Können und der Erfahrung des Durchführenden abhängig. So kann z.B. das schräge Auftreffen der Schallwellen auf die Sehne zu einer schlechteren Bildqualität und damit zu einer Fehlinterpretation führen (Dik u. van den Belt 1991). Die anatomische Lage großer Gefäße muss immer berücksichtigt werden.

Die sonographische Untersuchung erfordert Zeit und Geduld. Erst wenn eine pathologische Veränderung in den verschiedenen Darstellungen (mindestens 2 Ebenen) an derselben Stelle wiederzufinden ist, handelt es sich nicht um einen Artefakt (Stadtbaumer 1988).

Als Weiterentwicklung der konventionellen B-Mode Sonographie gibt es seit einigen Jahren die Möglichkeit der quantitativen Analyse der Sehnenintegrität mit Hilfe der UTC-Untersuchung (ultrasonographic tissue characterisation). Dabei wird die B-Mode Ultraschallsonde in einer elektrisch betriebenen Führungsschiene parallel am Bein entlang bewegt. Die Querschnittsbilder werden mit Hilfe einer speziellen Software zu einem dreidimensionalen Block zusammengesetzt. Das Programm errechnet dabei die Stabilität des Grauwerts jedes Pixels im Verlauf über mehrere sukzessive Querschnittsbilder hinweg (Van Schie et al. 2010, Roggel 2013). Vorteile dieser Technik sind die Unabhängigkeit von Einflüssen des Untersuchers und die Gewinnung longitudinaler Informationen (Roggel 2013).

6.3 Radiologische Untersuchung

Die Diagnose mit Hilfe von Röntgenaufnahmen wird vorwiegend im Zusammenhang mit Erkrankungen der knöchernen Ursprungs- und Ansatzregionen herangezogen. Sesamoidosen, Avulsionsfrakturen und vermehrte Sklerosierung lassen sich gut darstellen (Rijkenhuizen et al. 2007). Auch die Erkrankung der den Fesselträger umgebenden knöchernen Strukturen kann mit Hilfe von Röntgenbildern verifiziert werden. Häufige Erkrankungen sind in diesem Fall Frakturen der Griffelbeine oder auch traumatisch bedingte proliferative Periostitiden oder Frakturen im Bereich des

Röhrbeins (Dyson et al. 1995). Bei chronischen Erkrankungen des Fesselträgers kann eine Kalzifikation des reparierten Sehnengewebes röntgenologisch dargestellt werden.

6.4 MRT

Die Untersuchung mit Hilfe der Magnetresonanztomographie stellt im Bereich der Weichteilerkrankungen wie der des Fesselträgers den Goldstandard dar. Im Vergleich zur Untersuchung mit Hilfe des Ultraschalls lassen sich dadurch die genannten Artefakte und Möglichkeiten der Fehlinterpretation des Gewebes auf ein sehr geringes Maß reduzieren. Auch die limitierenden anatomischen Gegebenheiten, wie der mediale und laterale Rand des Fesselträgerursprungs, eingebettet in die Griffelbeine, nehmen keinen Einfluss auf die Darstellbarkeit der Sehne. Die Erkennung von erkranktem Gewebe ist somit präziser. So können z.B. mit Hilfe des MRT Sehnenbereiche mit deutlich abnormer Signalstärke diagnostiziert werden, obwohl sie bei der sonographischen Untersuchung keinerlei pathologische Befunde aufwiesen, bzw. sonographische Befunde vorwiesen, welche nicht krankheitsrelevant waren (Bischofberger et al. 2006, Dyson 2003).

6.5 Biopsie

Erste Erfahrungen mit der Entnahme und Auswertung von Biopsien aus Sehnengewebe stammen aus der Humanmedizin. Movin et al. (1997) untersuchten an der Achillessehne des Menschen die Möglichkeiten der Anwendung der Feinnadelbiopsie. Dabei wurde mit einer Biopsienadel (Durchmesser: 1,2mm) in einem Einstichwinkel von 25-40° je 10-17mm lange Gewebestücke gewonnen. Von insgesamt 104 Gewebeproben konnten 99 lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Bei Pferden wurde erstmals von Webbon (1986) die Entnahme von ca. 1x1cm großen Gewebestücken nach einem Hautschnitt aus der OBS und der lateralen Strecksehne bei Ponys durchgeführt. Der Eingriff verlief in Vollnarkose. Diese Methode wird allerdings nicht als Routinediagnostik von Tendopathien empfohlen, da der Strukturverlust zu Funktionsverlusten und Lahmheiten führte.

Von Becker et al. (2001) wurde eine neuartige, weniger invasive Methode etabliert. Die von 24 Warmblutfohlen, ebenfalls unter Allgemeinanästhesie, entnommenen Gewebeproben waren ca. 1cm lang und max. 0,1cm dick. Die Biopsien wurden nur in den Randbereichen der Sehnen durchgeführt, da die Autoren einen Eingriff in das Zentrum der Sehne für zu invasiv hielten. Die Biopsien wurden, ebenso wie die Sehnen selbst, nach Euthanasie der Fohlen histologisch und ultrastrukturell untersucht.

Wagels (2000) stellte erstmals die schonende Methode der Feinnadelbiopsie am Pferd dar. Die gewonnenen Sehnenfragmente aus der OBS und TBS des Pferdes besaßen einen Durchmesser von 0,9mm. Die Entnahme erfolgte am stehenden Pferd. Die Pferde wurden für den Eingriff teilweise sediert. Pferde, die mehrmals biopsiert wurden, waren nur bei der ersten Entnahme sediert. Diese Pferde zeigten die gleiche Reaktion während der Durchführung der Biopsie, mit oder ohne Sedation. Nach dem Eingriff wurden die Pferde klinisch und sonographisch untersucht. In 6 von 22 Fällen kam es zu sonographisch darstellbaren Reaktionen der Unterhaut, mehrfach kam es zu lokalen Blutungen. Nach 14 Tagen ließen sich diese Veränderungen nicht mehr nachweisen. Zu keinem Zeitpunkt ließ sich die Stelle der Gewebeentnahme sonographisch darstellen.

Als wichtige Anhaltspunkte der Durchführung von Feinnadelbiopsien wurden von Wagels (2000) folgende Kriterien festgehalten:

- Der Einsatz eines geeigneten Biopstatentnahmegerätes
- Eine chirurgische Vorbereitung der Entnahmestelle, steriles Arbeiten und das Anlegen eines Schutzverbandes mit lokaler antiseptischer Salbe nach Entnahme der Biopsie
- Den Einstich durch die gestraffte Haut, in einem Einstichwinkel von 45-69° um ein senkrechtes Anschneiden der Kollagenfasern zu vermeiden
- Ein sofortiges Verbringen des Biopstats in ein entsprechendes Fixiermedium

Eine histologische Untersuchung der Auswirkungen von Feinnadelbiopsien erfolgte durch Rühmann (1999). Bereits 4 Wochen nach der Entnahme zeigte sich ein gefäßreiches Granulationsgewebe im gesamten Stichkanal. Nach 10 Monaten war der Bereich noch fein darstellbar, konnte aber nicht in allen Fällen nachgewiesen werden. Diese Technik wird als geeignet betrachtet um am lebenden Tier die Bewertung von Sehnengewebe durchzuführen (Rühmann 1999).

Buck (2003) wandte die Methode der Feinnadelbiopsie zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung des Sehnengewebes an Beugesehnen des Pferdes an. Dabei wurde ein automatisches Biopsiesystem mit Federmechanismus der enthaltenen Biopsienadel („Manan Pro-Mag 2.2“, Fa. Manan, USA) eingesetzt. Die festgelegte Eindringtiefe der Hohlneedle beträgt 22mm, der Außendurchmesser 0,9mm (20G) und die Halbprofil-Aussparung 16mm. Die Nadelspitze der Biopsienadel wurde an der erkrankten Sehne an aufgehobener Gliedmaße in einem Winkel von 40° in proximaler Richtung aufgesetzt und nach Ankündigung ausgelöst. Die entstehenden Läsionen haben nach bisherigen Erkenntnissen keinen Einfluss auf die Zugfestigkeit der Sehne (Buck 2003). Die Zugänglichkeit der Durchführung der Feinnadelbiopsie am M. interosseus medius wurde in dieser Studie erstmals als gut beschrieben.

6.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die ultrastrukturelle Untersuchung von Sehnengewebe mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ist eine etablierte und weit verbreitete Methode. Meist wird dabei anhand eines transversalen Schnittbildes die Morphologie der Kollagenfibrillen untersucht (Kadler et al. 1996). Ziel vieler Studien ist es einen Zusammenhang zwischen dem Erscheinungsbild der Kollagenfibrillen und anderen Faktoren wie der mechanische Stabilität, dem Proteoglykangehalt, einem vorhandenen Gen-Defekt oder einer Erkrankung des Gewebes, zu erkennen.

Die ultrastrukturelle Untersuchung der Kollagenfibrillen wurde in der Humanmedizin z.B. im Zuge der Erforschung der akromesomelen Dysplasie von Typ Hunter-Thompson angewandt (Mikic et al. 2001). Diese selten autosomal rezessiv vererbte Entität äußert sich in erster Linie in einer Kleinwüchsigkeit der Gliedmaße und einer Dysplasie der großen Gelenke. Der verantwortliche Gen-Defekt lässt sich auch bei Mäusen finden. Die betroffenen Mäuse zeigen eine identische, jedoch etwas geringere phenotypische Ausprägung. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob sich bei den kranken Mäusen Unterschiede im ultrastrukturellen Aufbau der Kollagenfibrillen im Sehnengewebe der Achillessehne im Vergleich zu Sehnen gesunder Referenztiere finden lassen. Es wurde sowohl die mechanische Zugfestigkeit als auch die Ultrastruktur ermittelt. Bei 80 000facher Vergrößerung

wurden unter dem Elektronenmikroskop (TEM) jeweils 10 Bilder pro Achillessehne angefertigt und nach Einscannen der Fotos mit der Software ImagePro Plus (Media Cybernetics, L.P.) ausgewertet. Es wurden der Fibrillendurchmesser (bemessen an kleinster Stelle, um oval angeschnittene Fibrillen nicht fehlzuinterpretieren), die Fibrillenfraktion (entspricht der prozentualen Fläche des Querschnitts, welche mit Kollagenfasern bedeckt ist, im Vergleich zur Gesamtfläche) und die Fibrillenanzahl pro Flächeneinheit (Fibrillendichte) ermittelt. Auf ultrastruktureller Ebene zeigten sich einzig Unterschiede in den Durchmessern der einzelnen Fibrillen. Die erkrankten Sehnen zeigten eine Tendenz zu einem größeren Anteil dünner Fibrillen (30-104nm Durchmesser), die gesunden Sehnen hingegen mehr einen Tendenz zu dickeren Fibrillen (Durchmesser: 250-28nm). Die mechanischen Eigenschaften der Sehnen von erkrankten Mäusen unterschieden sich signifikant von denen gesunder Mäuse. Die Autoren kamen zu der Folgerung, dass neben den anatomischen Fehlentwicklungen die geringere Festigkeit der Sehnen und Bänder ein Auslöser für die Dislokation der Gelenke sein könnte (Mikic et al. 2001).

Die Morphologie von Kollagenfibrillen wurde auch von Rigozzi et al. (2010) untersucht. In dieser Studie wurden die Achillessehnen von zwei verschiedenen Mäuserassen untersucht. Die beiden Rassen wiesen einen unterschiedlichen Phänotyp ihres knöchernen Skeletts auf. Dies zeigt sich in Form von unterschiedlicher Knochendichte und unterschiedlichen Knochendurchmessern, bei identischer Körpergröße und Gewicht. Dabei besaß die C3H-Rasse den Phänotyp der höheren Knochenmasse und die B6-Rasse den Phänotyp geringeren Knochenmasse. Die Achillessehnen der adulten euthanasierten Mäuse wurden mit dem TEM untersucht bei einer 40 000 fachen Vergrößerung. Dabei wurden die Bilder mit dem Programm „The MathWorks, Version 7.4“ ausgewertet. Durch Erkennung der einzelnen Fibrillenquerschnitte wurde weiter folgende Werte errechnet: Radius der einzelnen Fibrillen (kleinster Radius bei oval angeschnittenen Fibrillen), Fibrillenumfang und die Fibrillenoberfläche im Querschnitt. Zum ersten Mal wurden zudem noch Werte ermittelt um den Kontakt der Fibrillen untereinander besser darstellen zu können. Hierfür wurden die interfibrilläre Distanzen (kleinster Abstand zwischen benachbarten Fibrillen) und die Fibrillenkontaktflächen (Berührungsfläche von aneinanderliegenden Fibrillen) ermittelt.

Neben den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden noch der GAG-Gehalt und die mechanische Zerreißkraft der Sehnen ermittelt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Kollagenfibrillen der C3H Mäuse eine höheren durchschnittlichen Radius besitzen als jene der B6 Mäuse. Ebenfalls weisen diese Mäuse eine geringere Fibrillenoberfläche und einen niedrigeren Gehalt an GAG auf. Mit dieser Konstruktion erreichten sie eine höhere Elastizitätsgrenze. Die Fibrillenkontaktfläche, die interfibrillären Distanzen und die Fibrillenfraktion waren bei beiden Mäuserassen nicht signifikant unterschiedlich.

Ähnlich dieser Studie wurde in der Humanmedizin die Morphologie der Kollagenfibrillen im Bereich von rupturierten Achillessehnen elektronenmikroskopisch untersucht (Margnusson et al. 2002). Den erkrankten Patienten wurde im Verlauf der chirurgischen Versorgung der akuten Ruptur der Sehnen eine Gewebeprobe aus dem Zentrum, der Peripherie und 3-5cm proximal der Ruptur entnommen. Der Eingriff erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach der erlittenen Ruptur. Als vergleichbare Referenzgewebe wurden 10 Menschen während forensischer Autopsien entsprechende Gewebeproben entnommen. Diese Personen entsprechen jeweils dem Alter und Geschlecht der Patienten. Die Proben wurden fixiert, eingebettet, ultradünn geschnitten und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Kollagenfibrillen wurden bildlich festgehalten bei einer 210 000 fachen Vergrößerung. Die Analyse der Bilder erfolgte mit Hilfe der C.A.S.T.-grid Software (The International Stereology Center, Olympus Denmark). Pro Bild wurden insgesamt 16 Zählrahmen gesetzt und ausgewertet. Die Fläche und die Anordnung der Zählrahmen im Bild waren bei allen Aufnahmen identisch. Ermittelt wurden die Fibrillenverteilung (Fibrillen / μm^2) und der Durchmesser der einzelnen Fibrillen. Es wurde auch bei dieser Studie der kleinste Durchmesser verwendet. Es stellte sich heraus, dass es in Bezug auf die Fibrillenverteilung keinen Unterschied zwischen der Lokalisation der Ruptur und des intakten Sehnenorgans gibt. Es war jedoch zu beobachten, dass im Zentrum und in der Peripherie der rupturierten Sehnenoberfläche weniger dicke Fibrillen (Durchmesser: 90-150nm) zu sehen waren als in unbeschädigtem Sehnenmaterial (Margnusson et al. 2002).

Die ultrastrukturelle Untersuchung von Kollagenfibrillen in Zusammenhang mit der Analyse der mechanischen Eigenschaften von Geweben wurde auch in der Transplantationsmedizin angewandt (Liao u. Vesely 2003). Ziel war es dabei die unterschiedlichen Belastbarkeiten und mechanischen Variationen von Chordae

tendineae der Mitralklappen auf ultrastruktureller Ebene zu erfassen. Die Untersuchungen wurden an Herzklappen von regulär geschlachteten Schweinen durchgeführt. Die Chordae wurden aus drei verschiedenen Lokalisationen der einzelnen Klappen gewonnen und es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Ermittlung der Zugfestigkeit mit Hilfe der Instron servohydraulic testing machine (Model 8511, Instron, Canton, Massachusetta), durchgeführt in körperwarmer, isotonischer Kochsalzlösung
- Messung des Durchmessers der einzelnen Chordae mittels calibriertem optischem Mikroskop
- Untersuchung der „crimp period“ durch Fixierung, Einbettung und Längsschnitt mit darauffolgender Färbung und Untersuchung unter polarisiertem Lichtmikroskop
- Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der Chordae (TEM)

Bei der ultrastrukturellen Untersuchung der Chordae wurden je 3 fotografische Aufnahmen pro Chorda angefertigt. Diese wurden zufällig platziert. Die weitere digitale Bildanalyse wurde mit Hilfe der Software Scion Image (Scion Corporations, MD) durchgeführt. Es wurde dabei der Fibrillendurchmesser, die Fibrillendichte und die Fibrillenfraktion ermittelt.

Die Ergebnisse in Korrelation gebracht zeigten, dass dicke Chordae eine höhere Zugfestigkeit und eine größerer Elastizität aufweisen als dünne Chordae. Große Chordae besaßen eine deutlich kürzere „crimp period“ als dünne Chordae. Hinsichtlich der Werte, ermittelt durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, ergab sich bei den dünnen Chordae ein Erscheinungsbild mit dünnen, aber dicht gepackten Kollagenfibrillen. Bei den dicken Chordae ein vermehrtes Auftreten dicker Kollagenfibrillen, in Zusammenhang mit einer insgesamt geringeren Fibrillendichte (Fibrillenanzahl pro Flächeneinheit) als bei dünnen Chordae. Es zeigte sich kein Unterschied bei der Fibrillenfraktion beider Gruppen (Liao u. Vesely 2003).

Die bereits im Abschnitt der Histologie des Fesselträgers genannte Studie zur Untersuchung der Rolle des Decorin in der Kollagen-Fibrillogenese der Haut von Reed u. Izzo (2003) beinhaltet ebenfalls elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kollagenfibrillen. Dabei wurde die Kollagenstruktur im Querschnitt von Decorin

Knockout Mäusen mit der Kollagen Morphologie gesunder Mäuse verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf Fibrillendurchmesser und Fibrillendichte.

Erste Untersuchungen der Ultrastruktur von Sehnen mit Hilfe des TEM im Heilungsverlauf wurden von Battaglia et al. (2003) durchgeführt. Inhalt dieser Studie ist die Untersuchung der Heilung von Achillessehnen von 31 Mäusen. Ein akuter Sehnendefekt wurde jeder Maus durch chirurgische Tenotomie der linken Achillessehne zugefügt. Die rechte Seite blieb dabei intakt und diente als Referenzobjekt. Zur weiteren Untersuchung wurden die Mäuse dann 7, 14, 21, 35 und 63 Tage nach der Tenotomie euthanasiert. Mit Hilfe der Instron Mechanical Testing Machine (Model 5542, Instron Corp., Canton, MA, USA) wurden die mechanischen Eigenschaften der erkrankten und gesunden Sehne gemessen. Dabei wurden folgende Parameter ermittelt: Die maximale Dehnungskraft bis zur Durchtrennung der Sehne, die maximale Dehnung (Distanz), die strukturelle Steifheit (ermittelt aus Dehnungskraft und Ausdehnung), und die absorbierte Energie. Die ultrastrukturelle morphologische Untersuchung wurde mit Hilfe des TEM durchgeführt. Die Kollagenfibrillen wurden dabei im Querschnitt betrachtet. Es wurden je 11 Fotos von 80.000facher Vergrößerung pro Sehne angefertigt, eingescannt und mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImagePro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) analysiert. Für jede Sehne wurden folgende Parameter ermittelt: Der mittlere Fibrillendurchmesser, Fibrillendichte (= Anzahl der Fibrillen pro mm^2) und die Fibrillenfraktion. Bei der Messung des Durchmessers wurde stets die geringste Strecke erfasst um oval angeschnittene Fibrillen nicht fehlzuinterpretieren.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen dass die Zerreißkraft der tenotomierten Sehnen nach 5-7 Wochen Heilungsphase bereits den Werten der Referenzsehnen entspricht. Der mittlere Fibrillendurchmesser der erkrankten Sehnen ist jedoch noch signifikant geringer im Vergleich zu den Fibrillendurchmessern der gesunden Sehnen. Während der beobachteten Heilungsperiode nahm die Anzahl der Fibrillen pro Flächeneinheit stets um 5% pro Woche zu. Aus diesen Erkenntnissen hervorgehend bietet allein die Fibrillendichte, bzw. die Fibrillenfraktion eine ausreichende Stabilität der Sehne, obwohl der Durchmesser der einzelnen Fibrillen deutlich kleiner bleibt als in gesundem Referenzgewebe. Es bleibt zu vermuten, dass die ultrastrukturelle

Morphologie nur ein Faktor unter vielen anderen Einflüssen bildet, welche die biomechanischen Eigenschaften von Sehnen bestimmen (Battaglia et al. 2003).

Die von Buck (2003) entnommenen Feinnadelbiopsien aus Sehnengewebe der distalen Gliedmaßen (OBS, TBS, UBTB, FT) dienten der weiterführenden Untersuchung mittel Rasterelektronenmikroskopie.

Im Vergleich zu Untersuchungen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie erhält man durch die Rasterelektronenmikroskopie eine Abbildung der Struktur als Ganzes und nicht einer Schnittebene. Bei einer Vergrößerung von 1:50.000 wurde Gewebe gesunder und erkrankter Sehnen betrachtet und beurteilt. Dies geschah mit einem dafür entwickelten Score-System. Die Sehnenstruktur wurde durch eine Fibrillertexturzahl und eine Fibrillenstärkezahl charakterisiert. Die Fibrillertexturzahl beinhaltete die Fibrillendichte, die Fibrillenparallelität und die Fibrillenlinearität. Die Fibrillenstärke bezeichnete den Anteil sehr dünner Fibrillen mit Durchmessern von $<80\text{nm}$ an der Gesamtheit der Fibrillen. Neben der Charakterisierung der Fibrillenstärke konnte vor allem die Fibrillenanzordnung gesunder Sehnen und der Heilungsstadien erkrankter Sehnen in Zusammenhang mit Befunden einer klinischen und ultrasonographischen Untersuchung, betrachtet werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten dass die Mikrostruktur der erkrankten Sehne in der Phase der fortgeschrittenen Sehnenheilung nicht dem Bild einer gesunden Sehne entspricht. Die durchgehende parallele Ausrichtung der Kollagenfibrillen ist nicht mehr möglich. Die Methode wurde von den Autoren als wertvolle Ergänzung zur herkömmlichen Diagnostik angesehen (Buck 2003).

7. Material und Methoden

7.1 Patientengut

Insgesamt wurden 30 Pferde in die Studie aufgenommen. Voraussetzung dafür war eine diagnostizierte Desmitis des M. interosseus medius. Diese Diagnose musste von einem Tierarzt gestellt sein und eine Lahmheits- und ultrasonographische Untersuchung beinhalten. Der vorhandene Fesselträgerschaden sollte mindestens eine Typ II Läsion sein. Anderweitig wurden keine weiteren Auswahlkriterien wie Alter, Geschlecht Rasse oder Nutzungsart berücksichtigt. Das Bestehen der Erkrankung war einzig von Bedeutung. Es musste sich dabei nicht um eine akut entstandene Erkrankung handeln, demzufolge wurden Pferde unterschiedlicher Erkrankungsdauer involviert.

Die Pferde wurden randomisiert in drei Gruppen eingeteilt. Es ergaben sich Gruppe A, B und C mit je 10 Pferden.

7.2 Klinische und ultrasonographische Untersuchung (Teil I der Studie)

Die vorangegangene klinische und ultrasonographische Untersuchung der Pferde, sowie die Einzelheiten der Durchführung der verwendeten Therapien werden in diesem Teil der Studie nur orientierend dargestellt. Eine detaillierte Darstellung ist der Arbeit von Banse (2011) zu entnehmen.

Unabhängig von der jeweiligen Therapiegruppe wurde jedes Pferd insgesamt drei Mal im Abstand von 6 Wochen vorgestellt und dabei klinisch und sonographisch untersucht. Nach jeder dieser Untersuchungen wurde eine Feinnadelbiopsie aus dem Bereich der Läsion des Fesselträgers für die elektronenmikroskopische Untersuchung entnommen. Teil der Erstuntersuchung war die Injektion des Therapeutikums oder des Placebos nach der Entnahme der Biopsie. Verwendet wurde dabei Platelet Rich Plasma (PRP), allogene, adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) oder ein Placebo. Jedes Pferd erhielt nach alleiniger Biopsientnahme oder in Kombination mit der anschließenden Injektion im Verlauf

der Erstuntersuchung einen Schutzverband welchen der Besitzer des Pferdes nach 2 Tagen selbständig entfernte.

Klinische und ultrasonographische Untersuchung

Nach Aufnahme des Signalements in Form von Name, Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht, Kennzeichen und Nutzungsrichtung wurde der Vorbericht der Erkrankung des Fesselträgers aufgenommen und in einem Protokoll dokumentiert. Die betroffene Gliedmaße wurde fotografisch festgehalten.

Die Lahmheitsuntersuchung erfolgte standardisiert nach Adams (Stashak 1989). Dokumentiert wurde die Art der Lahmheit, unterteilt in Hangbein-, Stützbein-, oder gemischte Lahmheit und der Grad der Lahmheit nach folgendem Einteilungsschema:

Tab. 1: Einteilungsschema der Lahmheitsgrade

Grad	Abkürzung	Beschreibung
0	-	Keine Lahmheit
1	+/-	Undeutlich: undeutlich sichtbare Taktunreinheit bzw. Lahmheit im Trab
2	+	Geringgradig: im Schritt keine, im Trab erkennbare Lahmheit
3	++	Mittelgradig: im Schritt erkennbare, im Trab deutliche Lahmheit
4	+++	Hochgradig: starke Lahmheit im Schritt

Der klinischen Untersuchung folgte zunächst die Entnahme von 18 ml Blut aus der V. jugularis, vermengt mit 2ml Gerinnungshemmer. Für die anschließende sonographische Untersuchung wurden die Pferde durch eine intravenöse Injektion von Detomidinhydrochlorid in einer Dosierung von 0,01mg/kg Körpermasse sediert. Die Untersuchung erfolgte mit dem Ultraschallgerät „Scanner Pie Medical Ixos Vet“, ausgestattet mit einer linearen, 4cm breiten, 7,5 MHz Sonde.

Die Untersuchung wurde mit Hilfe einer Vorlaufstrecke durchgeführt. Der Schallkopf wurde zuerst an der palmaren bzw. plantaren Seite der Gliedmaße sagittal, dann transversal von proximal nach distal geführt. Zur besseren Beurteilung der Fesselträgerschenkel wurden diese zusätzlich durch Schrägaufnahmen dargestellt. Mit Hilfe der Zoneneinteilung (modifiziert nach van Preyss 2008) wurde die Lokalisation im Protokoll festgehalten. Die Struktur des erkrankten Abschnitts und das Ausmaß der Läsion wurde anhand der Echogenität im Querschnitt beurteilt und nach dem von Genovese et al. (1986) und McClellan (1986) vorgeschlagenem Schema unterteilt. Der Faserverlauf und die Anheftung des Fesselträgers an den

knöchernen Strukturen wurden im Längsschnitt beurteilt. Die relevanten Sequenzen der erkrankten Bereiche wurden zusätzlich in Form von Videoaufnahmen festgehalten und auf Thermopapier ausgedruckt.

Tab. 2: Einteilungsschema des Läsionsausmaßes

Typ	Echogenität der Struktur	Ausmaß der Läsion in %
0	Normale Echogenität	0
I	Ggr. echoarm	1-25
II	Zu gleichen Teilen echoarm und echoreich	26-50
III	Zum größten Teil echoarm	51-75
IV	Vollständig echoarm	76-99
V	Komplette Ruptur	100

7.3 Therapien

Therapiegruppe A erhielt das Placebo. Dabei handelte es sich um das „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM). Ein standardisiertes, universelles Nährmedium für Zellkulturen dessen Hauptbestandteile Aminosäuren, Vitamine und anorganische Salze darstellen. Um den Vorgang der Therapie vor den Patientenbesitzern möglichst identisch zu gestalten wurde auch dieser Gruppe von Pferden 18ml venöses Blut entnommen und in einer Spritze mit 2ml Gerinnungshemmer vermischt. Dem Stammzellmedium wurde aus diesem Blut einigen Tropfen zugefügt, der Rest des Blutes wurde verworfen. Dadurch wurde ein optisch identisches Erscheinungsbild der drei verabreichten Substanzen erzeugt. Nach Biopotentnahme wurden insgesamt 2ml des Placebos injiziert.

Therapiegruppe B wurde mit Platelet Rich Plasma (PRP) behandelt. Das Thrombozytenkonzentrat wurde mit Hilfe eines spezifischen Kitts „SmartPreP2® APC-20+ Procedure Pack“ der Firma „Harvest Technologies®“ hergestellt. Bei der verwendeten Zentrifuge handelte es sich ebenfalls um ein Modell der Firma „Harvest®“ mit einem Rotor für 2 Schwenkbecher mit speziell konzipierten Einsätzen. In einem auf diese Weise erzeugten PRP liegt laut Hersteller die Konzentration der Thrombozyten bei $1.083.000 \pm 233.000 / \mu\text{l}$. Die Konzentrationsfähigkeit liegt somit bei $65 \pm 9\%$. Diese Menge entspricht dem, wiederum nach Biopotentnahme, injizierten Zellvolumen.

Zur Behandlung von Therapiegruppe C wurden adulte mesenchymale Stammzellen verwendet. Das entnommene Blut der Studienpferde dieser Gruppe wurde nicht weiter verwendet und verworfen. Die Stammzellen wurden dabei im Vorfeld der Studie einem Spendertier aus dem Knochenmark entnommen. Bei dem Spenderpferd handelte es sich um einen gesunden 2 Jahre alten Hengst. Die Entnahme erfolgte nach Einwilligung der Besitzer im Rahmen einer Kryptorchiden-Kastration aus der Medianen des Brustbeins. Das gewonnene Knochenmark wurde unmittelbar bei Raumtemperatur in das Labor der „Klinik und Poliklinik für Knochenmarks-, und Stammzellentransplantation“ des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf verbracht. Dort wurden die Stammzellen zunächst kultiviert und dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert. Ein Aliquot wurde vor Konservierung abgezweigt und auf phänotypische Merkmale und Differenzierungspotentiale untersucht. Die Charakterisierung des Phänotyps der generierten MSC wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Der überwiegende Teil der Zellpopulation erfüllte die Kriterien, die an eine reine MSC-Population angelegt werden. Dazu gehören eine hohe Positivität für den Histokompatibilitätskomplex I (MHC I) und die Oberflächenmerkmale CD90 sowie CD105 (Dominici et al. 2006). Gleichzeitig wiesen die Zellen eine Negativität für die Marker hämatopoetischer Zellen (CD45 und CD14) auf.

Das Differenzierungspotential der Zellen in osteogene, adipogene und chondrogene Zellen wurde mit Hilfe von spezifischen Färbungen bestätigt.

Vor einer anstehenden Behandlung wurden die Zellen 4-5 Tage zuvor aufgetaut und aufbereitet. Der Zellgehalt der zur Therapie eines Pferdes verwendeten Portion wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es wurde letztendlich eine Zellsuspension erstellt von 2 ml Volumen und einem Zellgehalt von 10 Millionen Zellen. Das Präparat wurde in einer eisgekühlten Transportbox in die Praxis transportiert und den Pferden aus Gruppe C, nach Entnahme der Biopsie intraläsional injiziert.

Für jedes Pferd wurde individuell je nach Grad und Alter der Erkrankung ein Rehabilitations-Protokoll (modifiziert nach Gillis 1997) erstellt. Dieser Bewegungsplan (siehe Anhang Banse 2011) wurde Pferdebesitzern in schriftlicher Form ausgehändigt mit der Anweisung ihr Pferd dementsprechend zu bewegen. Bei Bedarf

bestand die Möglichkeit der individuellen Beratung zur Optimierung des Hufbeschlags.

Um den Heilungsverlauf über die Untersuchungsperioden von 3 Monaten hinaus weiter zu beurteilen wurde 6 Monate nach der Behandlung ein Fragebogen (siehe Anhang Banse 2011) an die Besitzer der Studienpferde versandt. Nach Beantwortung der Fragen und Rücksendung des Dokuments wurde anhand von insgesamt 11 Fragen der Verlauf des Heilungsprozesses erörtert und mögliche Rezidive ermittelt.

7.4 Biopsie Entnahme Technik

Die Entnahme der benötigten Gewebeproben aus dem Bereich der jeweiligen Fesselträgerläsion wurde mit Hilfe eine „Biopsienadel 18 – G x 3“ “ der Firma Dispomed Witt oHg“ durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus einer Hohlneedle und einem darüber geführten, verschiebbaren Stilett. Die Eindringtiefe der Biopsienadel beträgt 22 mm. Insgesamt weist die Hohlneedle eine Länge von 9 cm und einen Außendurchmesser von 1 mm auf. Die zu gewinnende Gewebeprobe kommt in der 20 mm langen Halbprofilaussparung des zuerst in das Gewebe eingeführten Stiletts zum Liegen. Im zweiten Schritt wird die Hohlneedle über das Stilett geführt und die Gewebeprobe wird abgeschoren.



Abb. 6: Biopsienadel 18 – G x 3 (Dispomed Witt oHg)

Zur Vorbereitung der Biopsientnahme wurde zunächst das Ultraschallgel der vorangegangenen sonographischen Untersuchung mit alkoholischer

Desinfektionslösung (Ethanol) sorgfältig entfernt. Daraufhin wurde die zu durchstoßende Haut gründlich gereinigt und chirurgisch vorbereitet. Um Abwehrreaktionen durch lokalen Schmerz zu verhindern wird ein subkutanes Depot von 2ml Lokalanästhetikum „Minocain 2%®“, welches den Wirkstoff Procainhydrochlorid enthält, im Eindringbereich der Biopsienadel gesetzt. Nach abwarten von 5-10 Minuten bis zur Wirkung der lokalen Anästhesie wurde die Gliedmaße von einer Hilfsperson aufgehoben. Bei einigen Pferden war für die Biopsieentnahme eine zusätzliche Ruhigstellung durch eine Oberlippennasenbremse notwendig.

Die zu punktierende Stelle wurde dann unter sterilen Bedingungen von der den Eingriff durchführenden Person palpiert und somit möglichst genau lokalisiert. Vor dem Einführen der Nadelspitze wurde die Haut über der Einstichstelle zwischen Daumen und Zeigefinger gespannt.

Als erster Schritt wurde die Biopsienadel durch die Haut und weiter in das Gewebe, bzw. den Bereich der Fesselträgerläsion vorgeschoben. Als zweiter Schritt wurde die Hohnadel über das Stilett geschoben und abschließend wurden beide Elemente zusammen wieder herausgezogen. Zur Entnahme der Biopsie aus der Aussparung der Hohnadel wird anschließend das Stilett aus dem Gerät vorgeschoben. Die Gewebeprobe wurde aus der Hohnadel in ein vorbereitetes „Eppendorf-Röhrchen“ überbracht. Das Röhrchen wurde zuvor entsprechend beschriftet und mit 1ml entsprechendem Medium versehen in welches die Gewebeprobe unverzüglich nach der Entnahme eingegeben wurde.

Die Nachversorgung der Biopsiestelle am Pferd beinhaltete die Abdeckung durch einen Iod-Zehenpolsterverband. Der Verband verblieb 48 Stunden am Pferdebein und wurde von den Patientenbesitzern selbständig entfernt.

7.5 Transmissionselektronenmikroskopie und Entwicklung der Bilder

Die Gewebeprobe wurden unmittelbar nach der Entnahme in eine Lösung bestehend aus 3% Glutaraldehyd/0,05ml Phosphatpuffer eingebracht. Hierbei musste beachtet werden, dass die Fixierlösung maximal 1mm in das Gewebe eindringt. D.h. die Probe durfte maximal eine Kantenlänge von 2 x 2mm haben. Die hier entnommenen Proben hatten, wie die Hohnadel, einen maximalen Durchmesser von 1mm.

Der Ansatz für die Fixierlösung wurde wie folgt erstellt:

12ml 25% Gutaraldehyd, 25ml 0,2m Phosphatpuffer und 100ml Aqua Dest

Nach Eingang der Proben im Labor des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden die Gewebestücke vor der Einbettung nachfixiert. Dies geschah in einer Lösung aus 2% OsO₄ (Osmiumtetroxid) und 0,2m Phosphatpuffer/Saccharose zu gleichen Teilen. Die Proben verweilten eine Stunde in dieser Lösung. Das Osmiumtetroxid spielt eine wichtige Rolle zur Kontrastierung der Strukturen.

Entwässerung:

Nach der abgeschlossenen Fixierung wurden die Biopsien durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Dabei wird folgendes Protokoll angewandt:

Je 10-15 Min in 35%, 50%, 70%, 96% und 100%igem Ethanol, unvergällt.

Zur Einbettung wurden die Gewebeproben zunächst für 30 Min in Propylenoxid verbracht. Anschließend erfolgte eine Umbettung in eine Propylenoxid/Glycidether-Mischung (Mischverhältnis 1:1 für 60 Min und dann im Mischverhältnis von 1:3) für weitere 10 Stunden. Danach wurden die Proben in reinen Glycidether in speziellen Einbettungsformen verbracht und darin ausgehärtet durch Polymerisation bei 60°C.

Vor dem ersten Schnitt wurde zunächst von den Kunsthartblöcken das überflüssige Kunstharz um die Gewebeproben herum entfernt. Dies erfolgte im ersten Schritt am Schleifstein und im Weiteren unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Rasierklinge. Dabei wurde bereits darauf geachtet eine möglichst quadratisch bis rechteckige Schnittfläche zu schaffen.

Bestand nur noch ein dünner Saum von Kunstharz um die Gewebeoberfläche, wurde diese mit Hilfe eines Diamantmessers, eingesetzt in ein Ultramikrotom (Reichert-Jung 2050 SuperCut) geschnitten. Die Schnittdicke betrug hierbei 1µm. Die geschnittenen Gewebestücke wurden auf Aqua dest. aufgefangen, das sich im Trog des Messers befand. Aus diesem Trog wurden sie mit Hilfe einer Platinöse, zusammen mit einem kleinen Wassertröpfchen in Blockschälchen übertragen.

Die Semidünnschnitte wurden anschließend gefärbt mit Toluidin. Dafür wurden die Schnitte immer noch im Wasserbad schwimmend auf eine Wärmeplatte von 60-70°C aufgebracht. Die Färbung erfolgte ebenfalls im Wasserbad. Dazu wurde zunächst die Farbmischung bestehend aus: 2 Teilen 1%iges Pyroidinrot und 8 Teilen 1%igem

Toluidinblau dem die Proben enthaltenden Wasserschälchen zugeführt. Die Gewebeproben verweilten 3-6 Minuten im Färbebad. Zum Auswaschen überflüssiger Farbe wurden die Schnitte anschließend nacheinander in 3 separate mit Aqua dest. befüllte Schalen verbracht.

Aus den letzten Wasserschälchen wurden die Proben auf einen Objektträger überführt, getrocknet und mit „DePeX, Eindeckmedium Gurr®“ eingedeckt. Nun konnten die Semidünnschnitte unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Dies diente der groben Orientierung, bzw. gab Auskunft über die zu erwartenden Strukturen im Elektronenmikroskop. In diesem Schritt wurde ein geeigneter Ausschnitt ausgesucht und herausgetrimmt. In unserem Falle handelte es sich um Kollagenfibrillen die möglichst scharf im Querschnitt abgebildet waren.

Nach dem Semidünnschnitt wurde der finale Ultradünnschnitt wieder mit Hilfe des Ultramikrotoms erstellt. Als schneidende Klinge wurde hierbei wiederum ein Diamantmesser verwendet. Die entstandenen Schnitte waren 80-100nm dick. Eine Absorption der Elektronen wurde durch die geringe Dicke des Präparats gewährleistet.

Nach dem Schneiden wurde die Schnitte aus dem Wassertrog mit einem feinen Metallnetz aus Kupfer, genannt Grid, abgefischt. Die Grids mit den Schnitten wurden nun kontrastiert mit Schwermetallen nach Reynolds. Dazu wurden die Grids in einem ersten Schritt in eine 1%igem Uranylacetat-Lösung verbracht mit 20 Minuten Verweildauer. In einem weiteren Schritt wurden die Grids für 5 Minuten in eine 0,7%ige Bleicitrat Lösung gegeben. Nach vollständiger Trocknung konnten die Schnitte nun unter dem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet werden.

Die Betrachtung wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop CM 100 der Firma PHILIPS bei einer Vergrößerung von 1:30.000 durchgeführt. Die Fotos wurden mit einer analogen Kamera erstellt. Dabei wurde der Film : „MACO EM-Film“, 8,3 x 10,2cm der Marke „MACO Photo Products“ verwendet. Dieser Film verfügt über eine elektronenmikroskopische Empfindlichkeit von 20 x 200kV. Die Entwicklung des EM-Films erfolgte mit dem „Laborator 1200“ der Firma „Durst“. Es wurde des Fotopapier „B/W PAPER (PE/RC) 3 Normal, 310 Glossy, 18 x 24cm“ der Marke „Word“ verwendet. Von jeder Sehnenprobe wurden 6 Aufnahmen erstellt. Pro Pferd wurden also insgesamt von allen 3 Untersuchungszeitpunkten 18 Bilder entwickelt.

7.6 Bildbearbeitung und Auswertung

Die schwarzweißen Fotoabzüge im Format 18 x 24cm wurden zunächst eingescannt. Dies geschah mit dem „Dell All in One Center-968 AOI Printer“. Die Scanqualität betrug 300 DPI, was einer Auflösung von 300 Pixel pro 2,54cm (1 Inch) entspricht.

Die weitere Bildbearbeitung wurde mit dem Programm „Image J“ durchgeführt. Bei der Software handelte es sich um ein frei verfügbares, von dem NIH (National Institute of Health, USA) zur Verfügung gestelltes Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm. Bei Neustart des Programms wurde nach Öffnen des ersten Bildes eine Skalierung durchgeführt. Dabei wurde die auf der Bildkennzeichnung aufgeführte Strecke von 1µm als Referenzmaß genommen. Es wurde einheitlich auf 352,78 Pixel pro µm skaliert.

Als erster Schritt wurde das geöffnete Bild in eine Schwarz-Weiß-Darstellung umgeformt. Dabei wurden sämtliche Graustufen ausgeschlossen. Diese Darstellungsform nennt sich Binary.

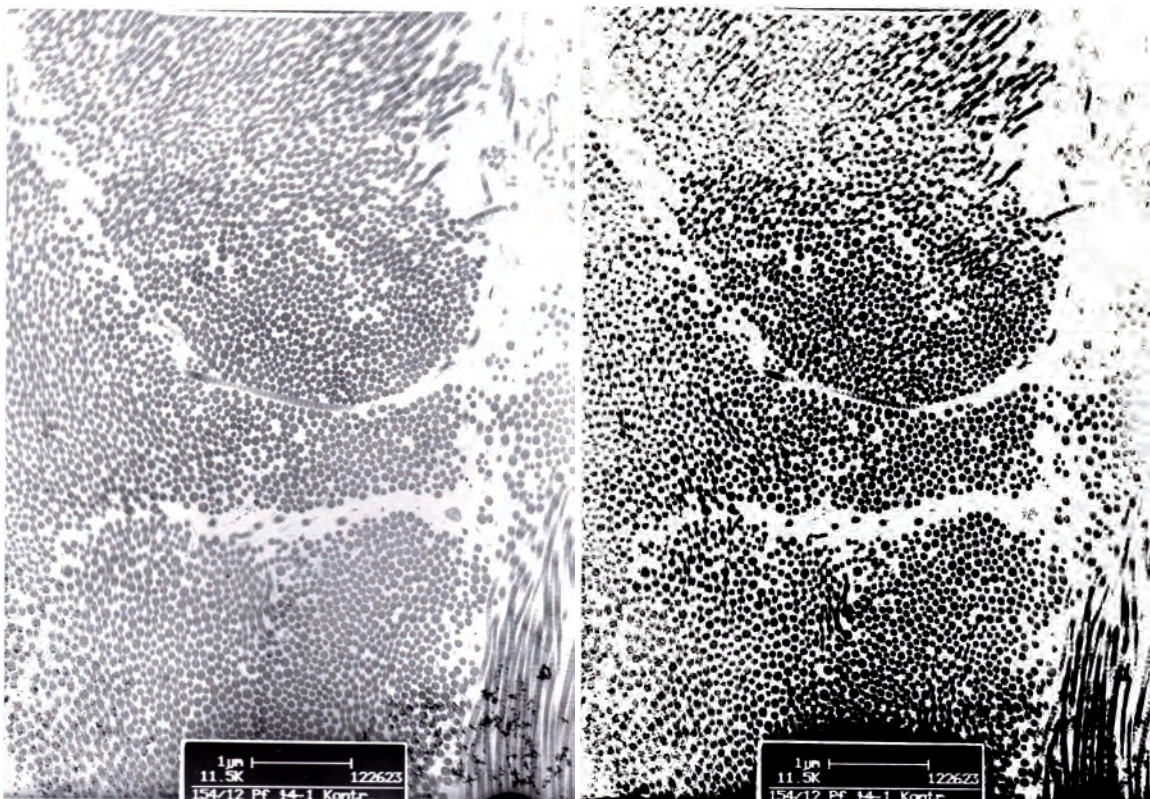


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. Links Original. Rechts Binary.

Zur Erstellung möglichst flächendeckender Binarys war es manchmal von Vorteil den schwarzweiß Kontrast der Originale zu erhöhen. Dies konnte auch mittels des Programms Image J geschehen. So erhöhte man die komplette Flächendeckende Schwärzung der einzelnen Fibrillenquerschnitte. Je nach Original führte eine Kontrasterhöhung von 0,5-10 % zu einem auswertbaren Ergebnis bei unzureichendem Kontrast.

Im Folgenden wurde aus dem Binary ein Watershed erstellt. Dabei wurden die einzelnen Pixel-Formationen voneinander getrennt. Es entstanden Trennungslinien zwischen den einzelnen Kollagenfibrillenquerschnitten. Nach Erstellen des Watershed wurde ein Bereich (Zählrahmen) von 1,5 x 1,5 μm ausgewählt auf dem die Fibrillen scharfrandig und möglichst rund in ihrem absoluten Querschnitt dargestellt waren.

Dieser Bereich wurde nun durch die Funktion „analyze particles“ ausgewertet. Flächen kleiner als 0,0009 μm^2 wurden nicht weiter berücksichtigt bei der Analyse. Insgesamt ergaben sich folgende errechnete Werte:

- Anzahl der Kollagenfibrillen
- Fläche, Umfang und Durchmesser jeder einzelnen Fibrille
- Anteil der fibrillenbedeckten Fläche im Vergleich zur Gesamtfläche in % (Fibrillenfraktion)

Die aufgeführten Ergebnisse wurden in Form von Excel-Tabellen zur weiterführenden Verarbeitung abgespeichert.

Die Folgenden Bilder zeigen den Ablauf der Bildbearbeitung.

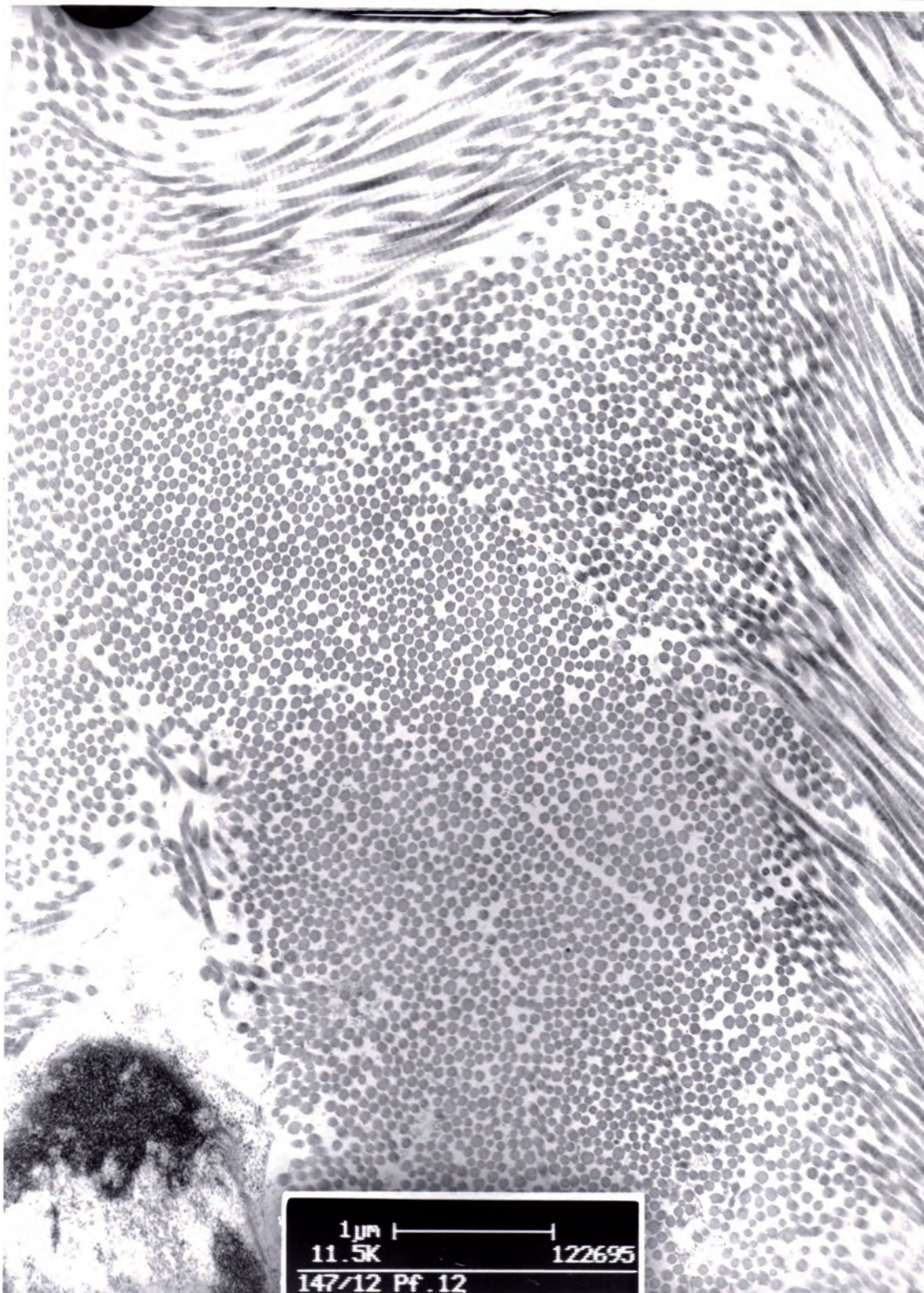


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Original

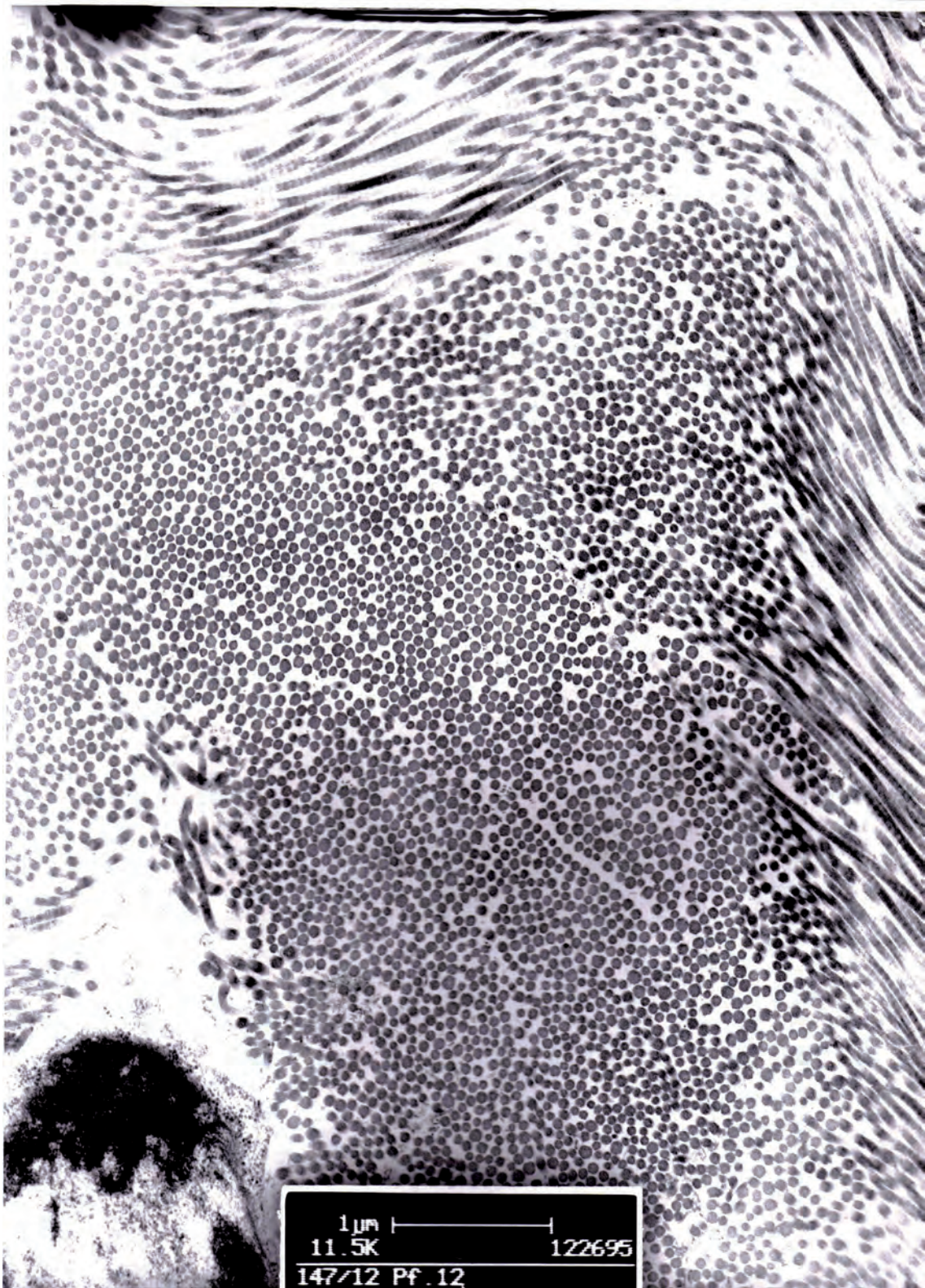


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Erhöhung des Kontrasts um 8%



Abb. 10: Binary Darstellung

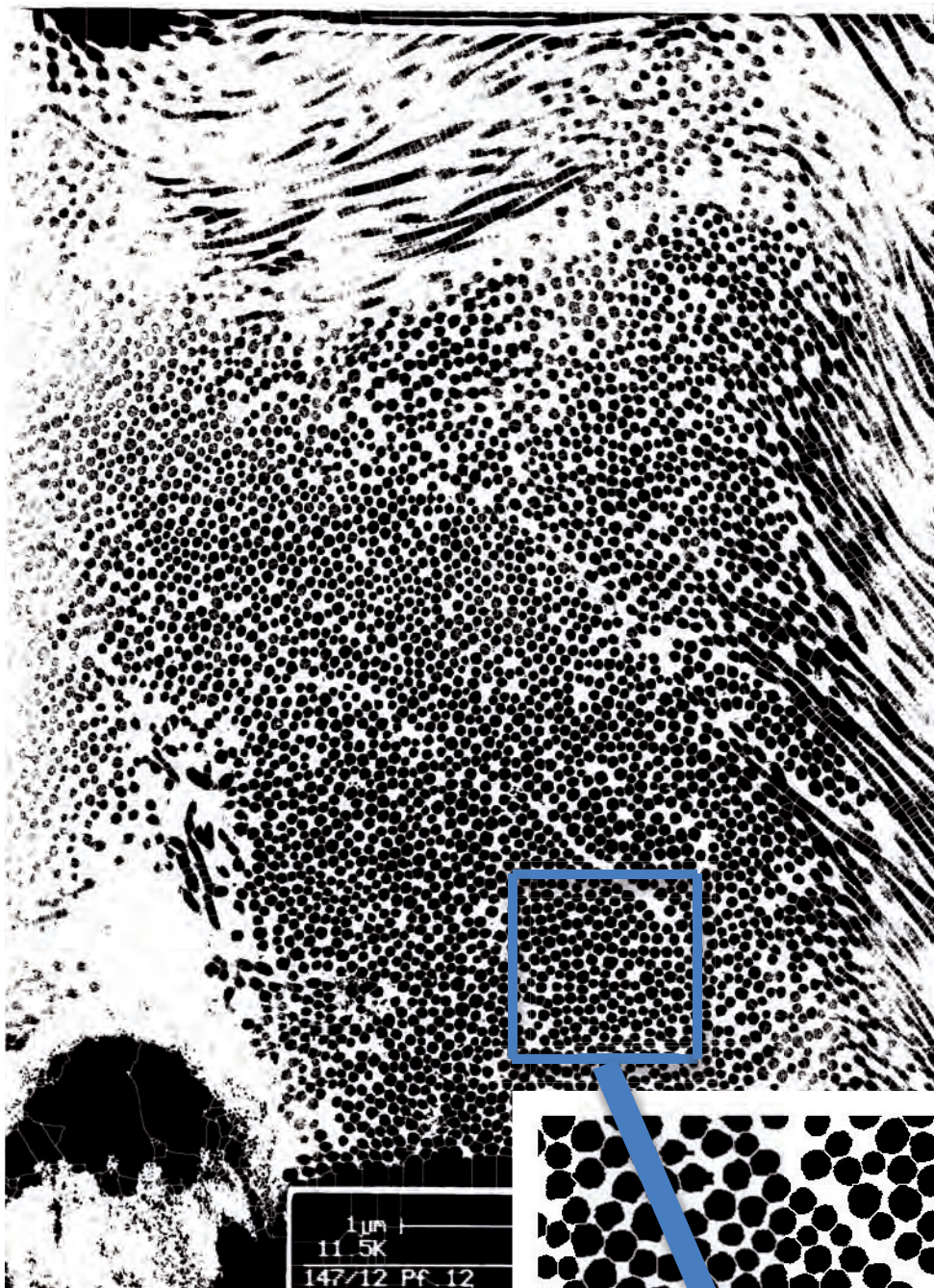


Abb. 11: Watershed Darstellung

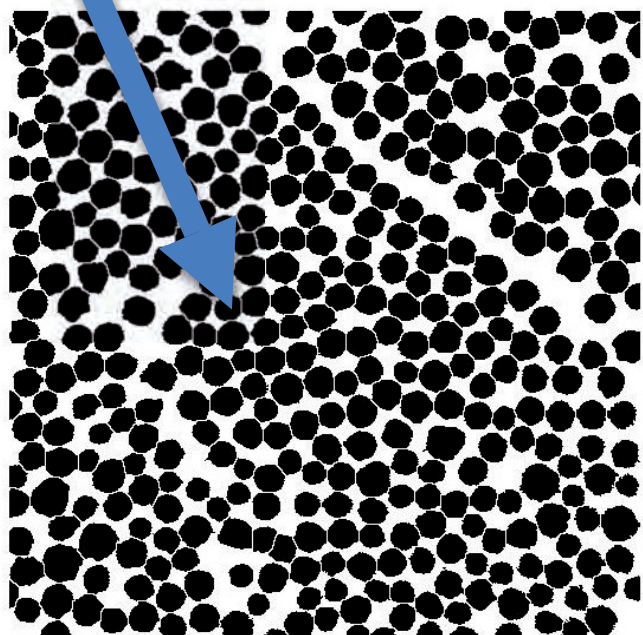


Abb. 12: Gewähltes Zählfenster

7.7 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erstellt. Dies geschah über das lokale Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe. Die Durchführung der statistischen Auswertung erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon 1993).

Die Datenbeschreibung erfolgte bei den Variablen Umfang, Durchmesser und Fläche der einzelnen Kollagenfibrillen durch die Angabe der Mediane, der Mittelwerte, der mittleren Quartilsabstände und der Standardabweichung.

Zur Überprüfung der Normalverteilung eines quantitativen (oder auch als metrische bezeichneten) Merkmals innerhalb der zu vergleichenden Gruppen wurden zunächst unter Zugrundelegen des entsprechenden linearen Modells mit dem Programm BMP1R die Residuen berechnet. Im einem folgenden Schritt wurden diese mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsplots, in diesem Falle des Q-Q-Plots, auf Normalverteilung überprüft. Bei Abweichung der Normalverteilung wurden die Originaldaten durch den Logarithmus numerisch transformiert. Mit den transformierten Werten wurde die gleiche Prozedur wiederholt. Als Ergebnis wurde auf diesem Wege die gegebenenfalls am besten geeignete Datentransformation identifiziert.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen- (A, B, C) und Zeiteinflusses auf Signifikanz wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ mit dem Programm BMDP2V, durchgeführt. Der Faktor „Zeit“ Bezog sich auf die drei Untersuchungszeitpunkte. Ebenso wurde eine zweifaktorielle Kovarianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Zeit“ dargestellt. Als Kovariable wurde hierbei die Erkrankungsdauer verwendet.

Der Therapieverlauf wurde statistisch mit Hilfe der Bildung der Differenz zwischen Erstuntersuchung und der 2. Kontrolluntersuchung in Form einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D, inklusive der Erstellung von Histogrammen, und einer einfaktoriellen Kovarianzanalyse mit dem Programm BMDP1V ermittelt. Die Kovariable stellte hierbei erneut die Erkrankungsdauer dar.

Die gescorten Werte der Ultraschall-, und Lahmheitsuntersuchung aus dem klinischen Teil der vorangegangenen Studie wurden statistisch gesondert betrachtet.

Ihr Einfluss wurde mit Hilfe des exakten Kruskal-Wallis-Test mit dem Programm „StatXact“ ermittelt (Cytel 2010).

Die Daten aus dem zweiten Teil dieser Studie, der Analyse der Fesselträger von gesunden Schlachtpferden wurden mit den Daten dieser Studie durch einen T-Test für unabhängige Stichproben mit dem Programm BMDP3D verglichen.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wurde, wenn möglich, der exakte p-Wert angegeben.

8. Ergebnisse

8.1 Patientengut

Tab. 3: Studienpferde

Pferd	Gruppe	Alter	Geschlecht	Gewicht in kg	Einsatz	Fehlstellung	Gliedmaße
1	B	12	Wallach	650	Dressur	vorhanden	Hinterbein
2	B	16	Wallach	650	Dressur	vorhanden	Vorderbein
3	C	9	Wallach	600	Dressur	vorhanden	Vorderbein
4	B	10	Wallach	680	Dressur	vorhanden	Hinterbein
5	A	14	Wallach	600	Springen	vorhanden	Hinterbein
6	B	11	Wallach	550	Freizeit	vorhanden	Hinterbein
7	B	14	Wallach	650	Dressur	vorhanden	Hinterbein
8	A	15	Wallach	600	Dressur	vorhanden	Vorderbein
9	B	7	Wallach	510	Dressur	vorhanden	Vorderbein
10	B	19	Wallach	480	Freizeit	vorhanden	Vorderbein
11	C	13	Wallach	660	Dressur	vorhanden	Hinterbein
12	C	13	Stute	610	Springen	–	Hinterbein
13	C	22	Stute	580	Zucht	vorhanden	Hinterbein
14	A	14	Stute	600	Freizeit	vorhanden	Hinterbein
15	C	9	Wallach	600	Dressur	–	Hinterbein
16	A	16	Wallach	520	Dressur	–	Vorderbein
17	A	19	Wallach	560	Freizeit	vorhanden	Hinterbein
18	A	8	Wallach	560	Dressur	vorhanden	Vorderbein
19	A	4	Stute	560	Freizeit	–	Hinterbein
20	B	14	Stute	520	Springen	vorhanden	Hinterbein
21	B	15	Wallach	500	Freizeit	vorhanden	Vorderbein
22	C	5	Stute	450	Freizeit	–	Hinterbein
23	B	15	Wallach	550	Freizeit	–	Hinterbein
24	C	9	Wallach	600	Dressur	vorhanden	Hinterbein
25	A	17	Stute	580	Freizeit	vorhanden	Hinterbein
26	A	15	Wallach	520	Dressur	vorhanden	Hinterbein
27	C	17	Stute	550	Dressur	vorhanden	Hinterbein
28	A	11	Stute	600	Vielseitigkeit	vorhanden	Hinterbein
29	C	6	Wallach	550	Dressur	–	Hinterbein
30	C	20	Wallach	550	Freizeit	vorhanden	Vorderbein

Insgesamt nahmen 30 Pferde an der Studie teil. Bei 28 Pferden handelte es sich um Pferd der Rasse deutsches Warmblut. Die restlichen 2 Pferde gehörten der Rasse Andalusier an.

Das Alter der Pferde betrug im Durchschnitt 13,97 Jahre. Das jüngste Pferd war dabei eine 4-jährige Stute, das älteste Pferd war eine 22-jährige Stute. Insgesamt gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Altersverteilung zwischen den drei Behandlungsgruppen. Die Hälfte der Studienpferde wurden als Reitpferde im

Bereich der Dressur genutzt. Weitere 10% waren als Springpferde im Einsatz. Aus der Disziplin der Vielseitigkeit war ein Studienpferd vertreten, ebenso aus dem Bereich der Zucht. Bei den verbleibenden 33,3% der Pferde handelte es sich um Freizeitpferde.

In Bezug auf die Geschlechterverteilung waren insgesamt 9 Stuten (30%) und 21 Wallache (70%) vertreten. Die Verteilung des Körpergewichts bezog sich bei überwiegend Warmblutpferden zwischen 450 und 680kg. Der Mittelwert lag im Gesamtkollektiv bei 573kg.

Erkrankungsdauer

Die Erkrankungsdauer wurde im Rahmen des Vorberichts ermittelt. Bei zwei Studienpferden war der Beginn der Erkrankung nicht mehr zu eruieren.

Tab. 4: Erkrankungsdauer in Monaten

Gruppe	MW	SD	Med	Min.	Max.	N
Insgesamt	14,70	23,70	5,5	0,5	120	28
Placebo	11,11	11,62	9	0,5	35	9
B	18,17	38,89	2,5	0,75	120	9
C	14,80	14,01	8,5	1	36	10

Der Mittelwert der Erkrankungsdauer betrug bei den restlichen 28 Pferden 14,7 Monate. Der Median lag deutlich darunter, bei 5,5 Monaten.

Betrachtet man die einzelnen Behandlungsgruppen separat, so zeigt sich in der Gruppe A ein Median von 9 Monaten Erkrankungsdauer. Bei Pferden in Gruppe B bestand eine Erkrankung des Fesselträgers im Median seit 2,5 Monaten, und in Gruppe C seit 8,5 Monaten. In jeder Gruppe befanden sich je zwei Pferde welche vor 4 Wochen oder weniger erkrankten.

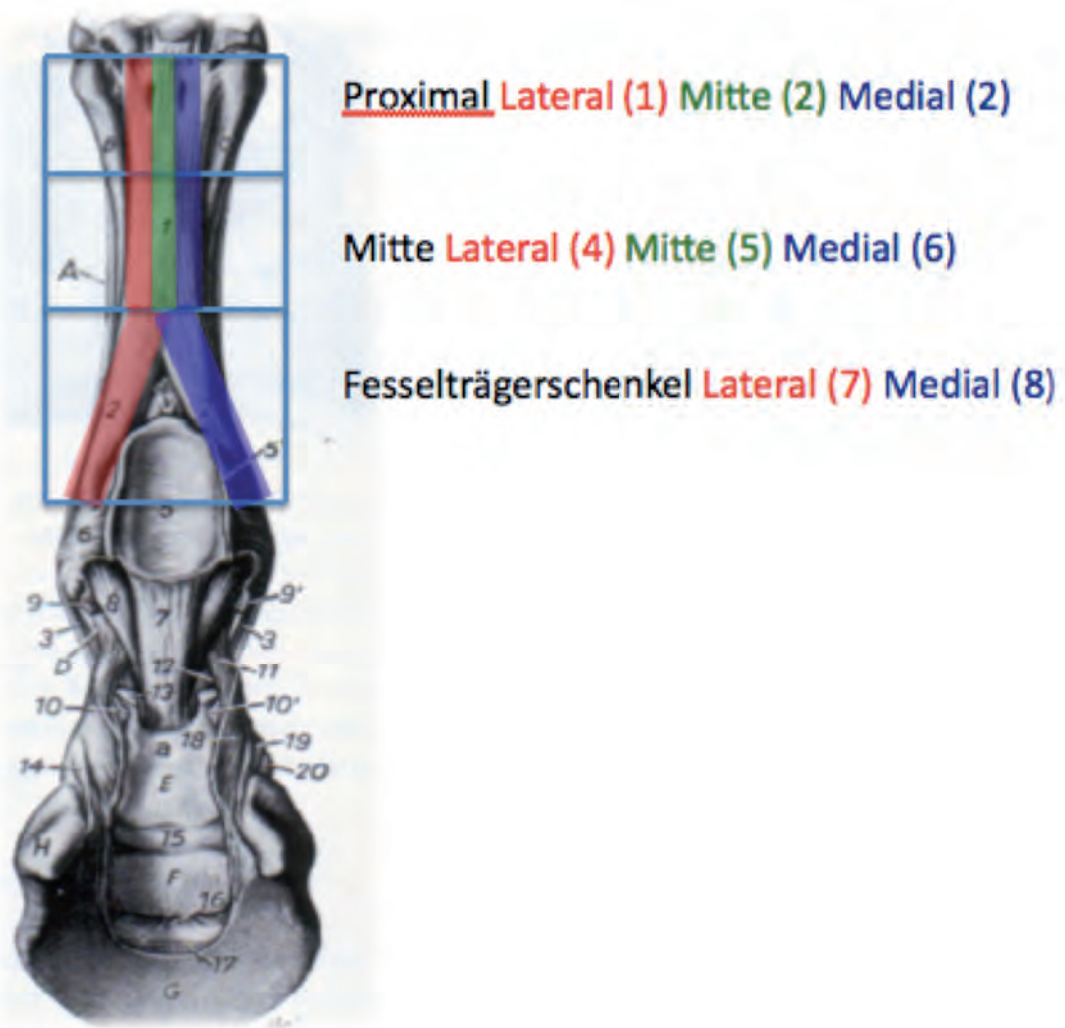


Abb. 13: Einteilung der Lokalisationen (modifiziert nach Nickel et al. 2001)

Bei der erkrankten Struktur handelte es sich bei 9 Pferden (30%) um den M. interosseus medius einer Vordergliedmaße, bei 21 Pferden (70%) war diese Struktur einer Hintergliedmaße betroffen.

Tab. 5: Betroffene Gliedmaße und Lokalisation

Gliedmaße	Lokalisation	Anzahl an Pferden	Anteil in Prozent
Vorderbein	1	1	3,3%
	2	1	3,3%
	3	0	0,0%
	4	1	3,3%
	5	0	0,0%
	6	0	0,0%
	7	2	6,6%
	8	4	13,3%
Hinterbein	1	3	10,0%
	2	4	13,3%
	3	2	6,6%
	4	0	0,0%
	5	0	0,0%
	6	0	0,0%
	7	9	30,0%
	8	3	10,0%

Insgesamt erkrankten 11 Pferde (37%) im proximalen Bereich (Lokalisation 1-3) und 18 Pferde (60%) an den Schenkeln des Fesselträgers. Ein Pferd war von einer Läsion des mittleren Fesselträgerkörpers betroffen. 21 der 30 (70%) Studienpferde erkrankten an der Hintergliedmaße. Insgesamt bildet die Lokalisation des lateralen Fesselträgerschenkels der Hintergliedmaße mit 9 Studienpferden (30%) die am häufigsten erkrankte Struktur des M. interosseus medius in dieser Studie.

Fehlstellungen

Bei 23 der 30 Studienpferde zeigte sich eine Fehlstellung. Bei 11 Pferden (47,8%) handelte es sich dabei um eine vermehrte Durchtrittigkeit im Fesselgelenk. Weiter zeigten 9 Pferde (39,1%) eine vermehrte Fußung auf der Außentrachte des Hufes, bzw. führten die gesamte Gliedmaße nach außen. Als ebenfalls auftretende Fehlstellung war bei 2 Pferden (8,7%) eine gerade Winkelung im Sprunggelenk zu beobachten. Eines der Studienpferde (4,3%) besaß an betroffener Gliedmaße einen Bockhuf.

8.2 Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung werden in diesem Teil der Studie nur kurz erläutert. Details der Untersuchungen und graphische Darstellungen können der vorangegangenen Arbeit (Banse 2011) entnommen werden, ebenso die statistische Datenerhebung und Verarbeitung. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe von gescorten Werten festgehalten und miteinander verglichen. Die Einteilung der Score-Werte wurde im Kapitel der Methode dieser Arbeit genauer dargestellt.

Folgende Parameter wurden erhoben:

- Schwellung
- Lahmheitsgrad
- Ultraschall-Score

Schwellung

Das Schwellungsausmaß der Gliedmaßen hat im Verlauf der Untersuchungsperiode von insgesamt 3 Monaten in allen drei Gruppen abgenommen. Vor allem innerhalb der ersten 6 Wochen war eine Verringerung der Umfangsvermehrung festzustellen. Zwischen den 3 Therapiegruppen war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

Lahmheitsgrad

1. Eingangsuntersuchung:

Zu Beginn der Studie zeigten insgesamt 28 von 30 Pferden eine Lahmheit. Das Erscheinungsbild der Lahmheit zeigte sich als eine undeutlich geringgradige bis mittelgradige, gemischte Lahmheit. Auf weichem Untergrund verstärkte sich die Lahmheit im Vergleich zur Bewegung auf hartem Boden. Im Falle der Erkrankung des Fesselträgerursprungs zeigten die Pferde eine vermehrte Hangbeinlahmheit mit Verkürzung der Vorführphase. Diese Pferde zeigten zusätzlich auf gebogener Linie, mit dem betroffenen Bein auf der Außenhand geführt eine deutlichere Lahmheit, sowie vermehrte Schmerzhaftigkeit in engen Wendungen.

Pferde mit einer Erkrankung eines Fesselträgerschenkels zeigten hingegen eine vermehrte Stützbeinlahmheit.

2. Kontrolluntersuchung 1:

Zum Zeitpunkt der ersten Kontrolluntersuchung bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 3 Behandlungsgruppen.

Die Placebogruppe (A) hob sich unter den 3 Therapiegruppen hervor. In dieser Gruppe zeigten sich 5 von 6 Pferden, die bei der Erstuntersuchung eine deutliche Lahmheit zeigten, lahmfrei. Damit verbesserte sich der Anteil der lahmfreien Pferde von 10% auf 60%.

Auch die Pferde der anderen beiden Therapiegruppen zeigten insgesamt eine Verbesserung der Lahmheit. Auch in Gruppe B (PRP) ist im Median die Verbesserung der Lahmheit deutlich zu erkennen.

3. Kontrolluntersuchung 2:

Im zeitlichen Heilungsverlauf von 6 Wochen zwischen den beiden Kontrolluntersuchungen zeichnet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ab. Gruppe A und B verzeichneten eine geringere Verbesserung als im ersten Zeitintervall. Die Ergebnisse von Gruppe C (MSC) zeigten eine kontinuierliche Verbesserung über die drei Untersuchungszeitpunkte.

Sonographische Untersuchungen

1. Eingangsuntersuchung:

Die Gesamtheit aller Studienpferde zeigte bei der Untersuchung per Ultraschall im Median eine Läsion des Typs 2,5. Dies ergab sich aus den Ergebnissen der Gruppe A (2,5), B (3,0) und C (2,0).

Alle Befunde lagen zwischen den Score-Werten 1 und 3.

2. Kontrolluntersuchung 1:

Bei der ersten Kontrolluntersuchung zeigte sich in allen Gruppen eine Verbesserung des Median und des Mittelwertes. Der Median betrug zu

diesem Zeitpunkt 2,0 (A), 2,0 (B) und 1,75 (C). Auf das Gesamtkollektiv übertragen ergab sich ein Wert von 2,0.

3. Kontrolluntersuchung 2:

Auch bei der 3. Untersuchung zeigte sich eine weitere Verbesserung der Werte in allen 3 Gruppen. Der Median sank auf 1,5 (A und B) und 1,0 (C). Gruppenübergreifend ergab sich folglich der Wert 1,5.

Zusammenfassend wird deutlich dass in allen Gruppen eine Verbesserung des sonographischen Befundes über den Verlauf der 3 Untersuchungen zu verzeichnen war. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Verbesserung der Untersuchungsbefunde und einer Behandlungsgruppe bestand nicht.

Auswertung der Fragebögen

Insgesamt wurden von den 30 verschickten Fragebögen 26 beantwortet zurückgeschickt. Von den 26 Pferden waren insgesamt 21 Pferde nach einem Zeitraum von 6 Monaten nach Behandlungsbeginn lahmfrei. Weitere Informationen können ebenfalls der Vorgängerarbeit (Banse 2011) entnommen werden. Diese Studie befasst sich einzig mit dem Zeitraum der selbst durchgeführten Untersuchungen (12 Wochen).

8.3 Ergebnisse der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Biopsien des erkrankten Fesselträgers wurden insgesamt 6 Bilder pro Gewebeprobe bzw. pro Untersuchungszeitpunkt erstellt. Von den entstandenen Aufnahmen wurden je 4 der 6 Bilder ausgewählt und ausgewertet. Dabei wurde nach dem Kriterium der möglichst großflächigen, exakten Darstellung der Kollagenfibrillen im Querschnitt vorgegangen. Insgesamt konnten bei 24 von 30 Pferden (72%) je 4 Bilder pro Untersuchungszeitpunkt verwendet werden. Bei 3 Pferden ergab sich bei der Probe der Erstuntersuchung nur ein auswertbares Bild. Bei einem Pferd traf dies auf die Erstuntersuchung und die 2. Kontrolle zu. Bei einem weiteren Pferd war zum Zeitpunkt der 1. Kontrolle kein Bild verwendbar. Bei anderen weiteren Pferden konnte zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung nur ein Bild, zum Zeitpunkt der 1.

Kontrolle 3 Bilder und zum Zeitpunkt der 2. Kontrolle regulär 4 Bilder ausgewertet werden.

Für jedes der ausgewählten Zählfenster (1 Zählfenster pro Bild von 1,5 x 1,5 µm Größe) wurden folgende Parameter, mit Hilfe des Programms Image J, ermittelt:

- Fibrillenanzahl pro Zählfenster
- Fläche der einzelnen Fibrillen
- Durchmesser der einzelnen Fibrillen (kleinster Durchmesser)
- Umfang der einzelnen Fibrillen
- Fibrillenanteil (= Prozentualer Anteil der mit Fibrillen bedeckter Fläche im Vergleich zur Gesamtfläche)
- Fibrillendichte (= Anzahl der Fibrillen pro Flächeneinheit)

Aufgrund des großen Datenumfangs wurden die Einzelwerte für die statistische Weiterverarbeitung komprimiert. Pro Pferd und Untersuchungszeitpunkt wurden die Werte der Einzelfibrillen der 4 verwendeten Bilder zusammengefasst. Um eine möglichst genaue Charakterisierung zu erhalten wurden in einem weiteren Schritt der Mittelwert (MW), der Median (Med), die Standardabweichung (SA) und der mittlere Quartilsabstand (MQA) berechnet. Der Fibrillenanteil sowie die Fibrillendichte wurden pro Pferd und Untersuchungszeitpunkt durch den Mittelwert der 4 Bilder repräsentiert. Mit diesem Datensatz wurden die anschließenden Tests auf statistische Signifikanz durchgeführt.

Differenzanalyse

Um einen Unterschied im Verlauf der Studie festzustellen wurde eine Differenzanalyse durchgeführt. Dabei wurden die errechneten Werte der Erstuntersuchung den Werten der 2. Kontrolluntersuchung abgezogen. Ergebnis dieser Analyse war kein signifikanter Unterschied zwischen der Erstuntersuchung und der 2. Kontrolle sowie kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Einfluss des Lahmheitsgrades und des Ultraschallscores auf die Ultrastruktur des Fesselträgers

Die im Laufe der klinischen Studie ermittelten Lahmheitsgrade und Scores der sonographischen Untersuchungen erwiesen keinen signifikanten Einfluss auf das

ultrastrukturelle Erscheinungsbild (eletronenmikroskopische Darstellung) der untersuchten Bereiche der Sehnen.

8.3.1 Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen der drei Therapiegruppen im Vergleich hinsichtlich einzelner Messparameter

Fibrillendurchmesser

Der Durchmesser der Fibrillen betrug einen Median von ~ 90-100nm. Minima beliefen sich dabei auf Fibrillen mit Durchmessern von 66nm. Maxima reichten bis hin zu 186nm dicken Fibrillen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten sowie zwischen den einzelnen Therapiegruppen. Auch die statistischen Analysen der Mittelwerte, des MQA und der SA ergaben keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Beobachtungszeitraumes und der Therapiegruppen.

Tab. 6: Darstellung der Mediane des Fibrillendurchmessers in nm

Zeitpunkt	Gruppe	Mittelwert	SD	VK	Min.	Max.
Erstuntersuchung	Insgesamt	92.608	16.128	.17416	66.357	125.24
	Placebo	91.767	16.986	.18510	68.014	125.24
	B	93.704	10.804	.11530	72.458	108.64
	C	92.352	20.754	.22472	66.357	124.24
1. Kontrolle	Insgesamt	94.351	14.419	.15283	69.202	128.56
	Placebo	95.587	14.843	.15529	74.406	128.56
	B	97.643	15.813	.16195	69.202	126.93
	C	90.152	13.120	.14553	70.411	120.60
2. Kontrolle	Insgesamt	96.940	23.815	.24567	69.028	185.73
	Placebo	89.683	10.488	.11695	75.478	106.40
	B	98.149	20.850	.21243	70.010	141.22
	C	102.99	34.381	.33384	69.028	185.73

Darstellung der Fibrillendurchmesser der einzelnen Therapiegruppen im Verlauf

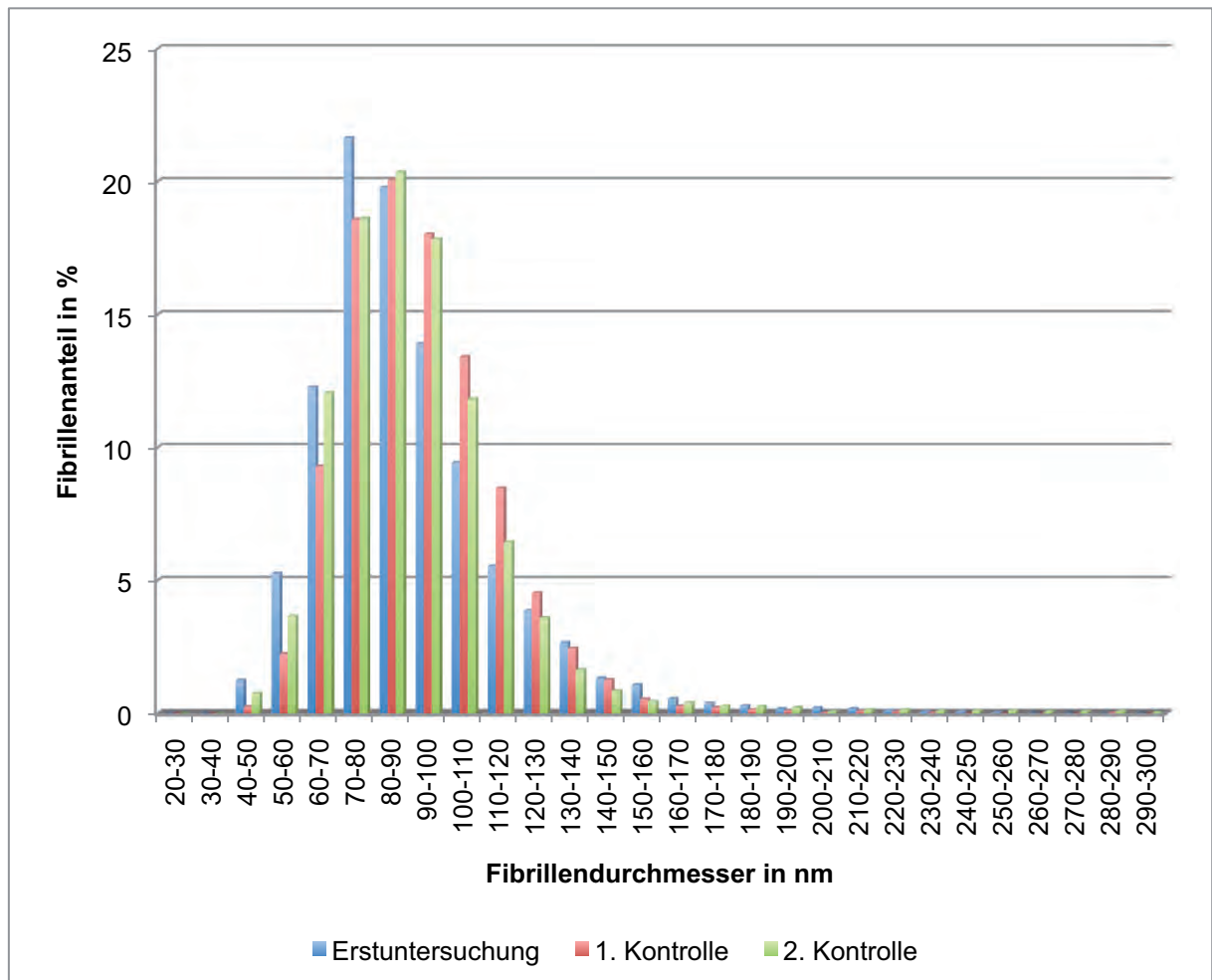


Abb. 14: Anteile Fibrillendurchmesser Gruppe A (Placebo) im Verlauf

In Gruppe A ist zu erkennen dass bei der Erstuntersuchung die dünnen Fibrillen mit Durchmessern bis zu 80nm vermehrt einen größeren Anteil der ausgewerteten Fibrillen darstellen im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen. In der Größenordnung von Fibrillen mit Durchmessern von 80-120nm liegt der Fibrillenanteil der Erstuntersuchung im niedrigeren Bereich als der Anteil der zwei Kontrolluntersuchungen. Im Bereich dickerer Fibrillen gleicht sich das Verhältnis aus und es findet sich kein geringerer Anteil an Fibrillen im Bereich von >130 nm im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen. Vergleicht man die Verteilung der Fibrillendurchmesser der beiden Kontrolluntersuchungen so erscheint die Ultrastruktur der 1. Kontrolluntersuchung insgesamt mit dickeren Fibrillen als die 2.

Kontrolluntersuchung. Der Fibrillenanteil der 2. Kontrolle übertrifft im Bereich von 40-80nm Durchmessern den Fibrillenanteil der 1. Kontrolle. Fibrillen mit Durchmessern von 90-160nm sind vermehrt bei der 1. Kontrolle vorzufinden im Vergleich zur 2. Kontrolle.

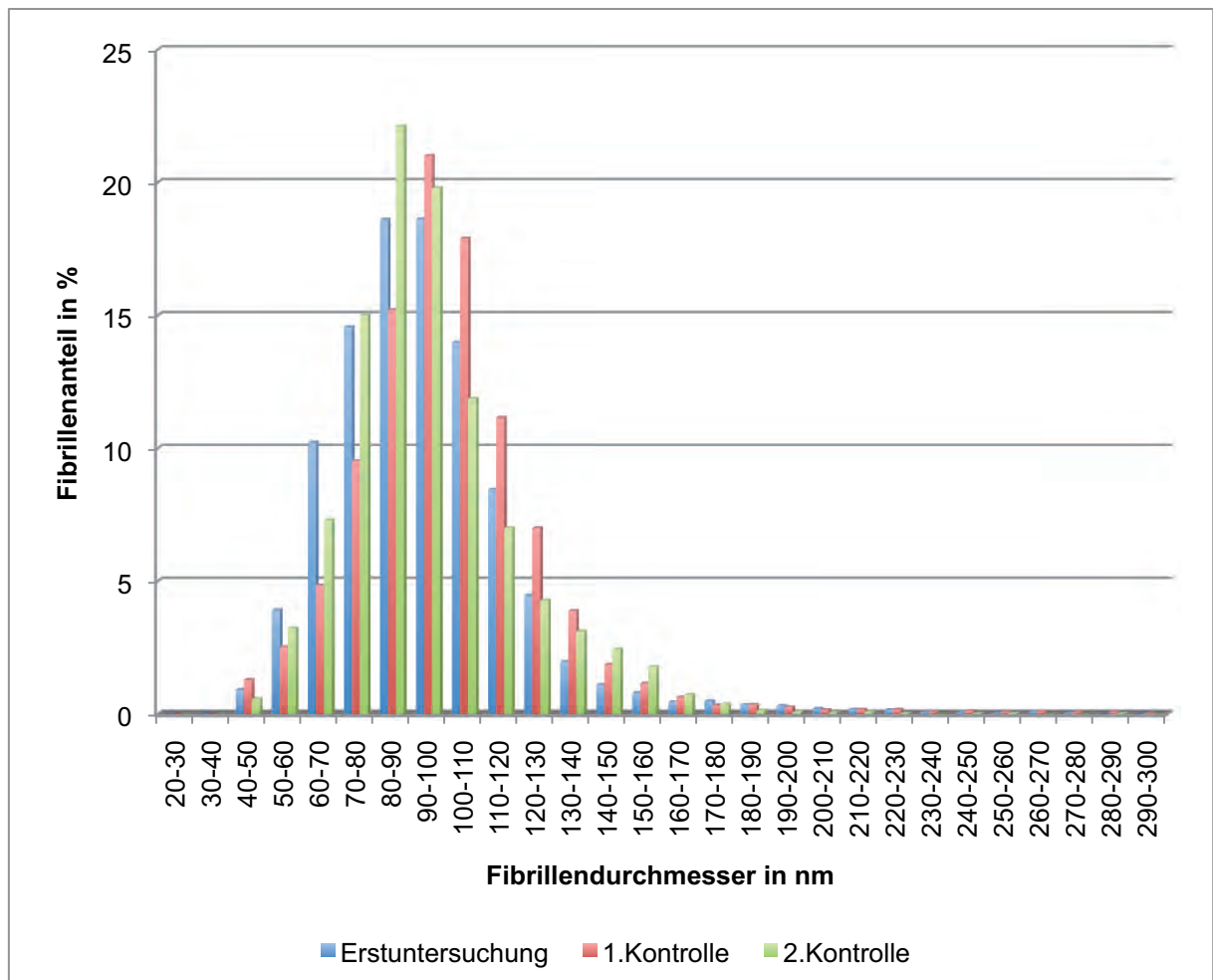


Abb. 85: Anteile Fibrillendurchmesser Gruppe B im Verlauf

In Gruppe B zeigt sich im Bereich der Fibrillen mit Durchmessern von 100-140 zum Zeitpunkt der 1. Kontrolluntersuchung ein größerer Anteil an Fibrillen als zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung und der 2. Kontrolle. Im Bereich noch dickerer Fibrillen (140-170nm) überwiegt die 2. Kontrolluntersuchung. Der Anteil dünner Fibrillen mit Durchmessern von >80nm unterschieden sich die drei Untersuchungszeitpunkte nicht deutlich voneinander. Einzig im Bereich von 60-70nm zeigt sich bei der Erstuntersuchung ein höherer Anteil an Fibrillen als zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchungen.

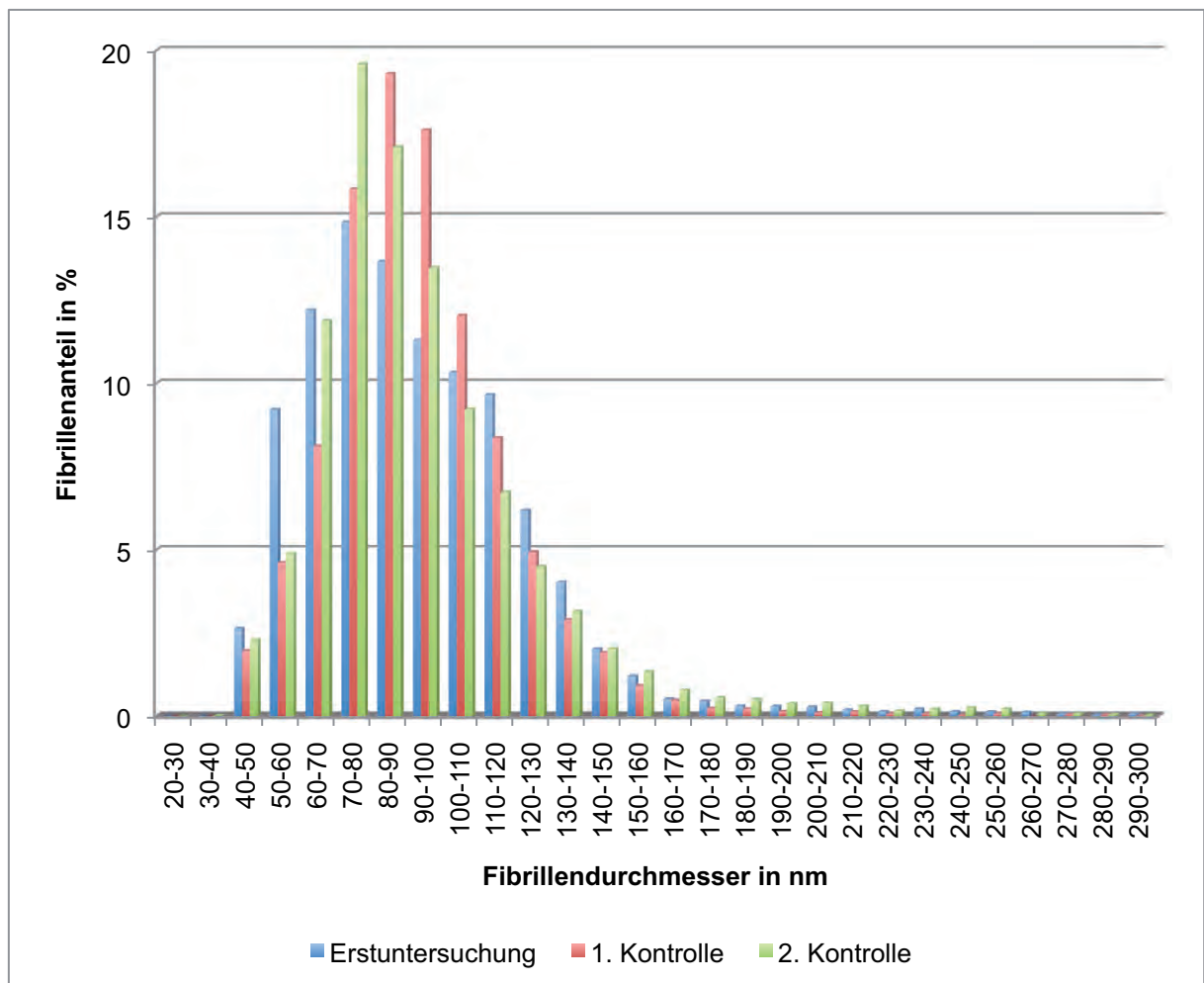


Abb. 16: Anteile Fibrillendurchmesser Gruppe C im Verlauf

In Gruppe C dominieren Anteile kleiner Fibrillen bis 70nm bei der Erstuntersuchung. Jedoch nur im Bereich von 50-60nm deutlich. Geringfügig ebenso im Bereich von 110-140nm. Fibrillen im mittleren Bereich von 70-110nm sind vorwiegend zu den Zeitpunkten der beiden Kontrolluntersuchungen vorhanden.

Fibrillenfläche

Die einzelnen Flächen des Querschnitts der Kollagenfibrillen zeigen im Median Werte von durchschnittlich ~ 4300 bis 6000 nm². Das Spektrum reicht dabei von ca. 1100 bis 9200nm² Fläche im Querschnitt. Bei den ermittelten Werten zeigt sich zwischen den Untersuchungszeitpunkten sowie zwischen den 3 Therapiegruppen kein signifikanter Unterschied. Gleiches gilt auch hier für Berechnungen mit den Mittelwerten, der SA und dem MQA.

Tab. 7: Darstellung der Mediane der Fibrillenfläche in nm²

Zeitpunkt	Gruppe	Mittelwert	SD	VK	Min.	Max.
Erstuntersuchung	Insgesamt	4472.9	1608.9	.35970	2153.0	8188.0
	Placebo	4373.7	1696.1	.38779	2353.0	8188.0
	B	4473.5	869.39	.19434	2953.0	5681.0
	C	4571.5	2164.9	.47357	2153.0	7963.0
1. Kontrolle	Insgesamt	4723.2	1652.2	.34981	1957.0	9192.0
	Placebo	4779.5	1660.4	.34740	2877.0	8951.0
	B	5232.7	1988.5	.38001	1957.0	9192.0
	C	4208.4	1289.8	.30648	2149.0	7027.0
2. Kontrolle	Insgesamt	5267.6	3009.5	.57132	2234.0	17284.
	Placebo	4230.2	1004.0	.23735	2989.0	5809.0
	B	5531.2	2604.7	.47091	2820.0	11394.
	C	6041.4	4410.5	.73005	2234.0	17284.

Fibrillenumfang

Die Mediane des Fibrillenumfangs liegen im Mittel zwischen ~ 280 und 306nm.

Es liegt kein signifikanter Unterschied der Werte der einzelnen Untersuchungszeitpunkte und der Werte der 3 Therapiegruppen vor. Im Median lagen dabei Fibrillen des Umfangs von ~ 205 (Min.) bis 612nm (Max.) vor.

Auch in Bezug auf den Fibrillenumfang ergaben die statistischen Berechnungen der Mittelwerte, SA und des MQA keinen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten und den Therapiegruppen.

Tab. 8: Darstellung der Mediane des Fibrillenumfangs in nm

Zeitpunkt	Gruppe	Mittelwert	SD	VK	Min.	Max.
<i>Erstuntersuchung</i>	Insgesamt	294.46	57.759	.19615	204.33	426.35
	Placebo	295.30	61.191	.20722	205.58	411.01
	B	293.44	38.996	.13289	216.90	346.58
	C	294.66	74.045	.25129	204.33	426.35
<i>1. Kontrolle</i>	Insgesamt	296.60	48.911	.16490	214.15	407.14
	Placebo	301.21	49.253	.16352	234.56	402.18
	B	305.64	49.984	.16354	226.72	403.56
	C	283.86	50.101	.17650	214.15	407.14
<i>2. Kontrolle</i>	Insgesamt	305.61	83.098	.27191	210.00	612.38
	Placebo	283.20	46.250	.16331	226.32	380.31
	B	309.13	70.964	.22956	210.00	441.58
	C	324.49	118.78	.36604	210.63	612.38

Fibrillendichte

Die Fibrillendichte stellt die Anzahl der Fibrillen pro Flächeneinheit dar. Die Flächeneinheit beträgt in diesem Fall das Zählfenster von $2,25\mu\text{m}^2$ bzw. $2.250.000\text{nm}^2$. Im Mittelwert beträgt die Dichte zwischen 116 und 147 Fibrillen/ $2,25\mu\text{m}^2$. Die geringste Fibrillendichte beträgt 38 Fibrillen/ $2,25\mu\text{m}^2$, die höchste Dichte beträgt 208 Fibrillen/ $2,25\mu\text{m}^2$. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten und den verschiedenen Therapiegruppen feststellen.

Tab. 9: Darstellung der Fibrillendichte

Zeitpunkt	Gruppe	Mittelwert	SD	VK	Min.	Max.
<i>Erstuntersuchung</i>	Insgesamt	133.76	41.213	.30811	56.111	208.44
	Placebo	147.08	36.730	.24973	89.444	187.89
	B	128.94	37.512	.29091	62.333	196.11
	C	125.26	49.128	.39222	56.111	208.44
<i>1. Kontrolle</i>	Insgesamt	129.73	28.618	.22060	69.778	199.67
	Placebo	136.36	31.920	.23408	92.000	199.67
	B	116.73	29.252	.25060	69.778	164.22
	C	134.79	22.851	.16953	85.556	164.22
<i>2. Kontrolle</i>	Insgesamt	123.87	37.474	.30253	38.000	188.89
	Placebo	130.49	36.457	.27939	79.667	188.89
	B	121.24	37.505	.30933	65.444	172.11
	C	119.88	41.416	.34548	38.000	178.44

Fibrillenanteil in Prozent

Der Fibrillenanteil beträgt im Mittelwert zwischen 58 und 65%. Die Werte reichen insgesamt von 45 bis 82%. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten und den verschiedenen Therapiegruppen feststellen.

Tab. 10: Darstellung des Fibrillenanteils in %

Zeitpunkt	Gruppe	Mittelwert	SD	VK	Min.	Max.
<i>Erstuntersuchung</i>	Insgesamt	61.196	8.0551	.13163	45.367	77.054
	Placebo	63.439	9.1676	.14451	46.294	77.054
	B	61.864	7.2006	.11639	45.367	69.139
	C	58.283	7.5939	.13029	45.538	69.875
<i>1. Kontrolle</i>	Insgesamt	63.862	7.4493	.11665	53.632	80.835
	Placebo	64.005	6.6113	.10329	55.928	78.126
	B	64.657	8.8964	.13759	54.225	80.835
	C	63.003	7.5568	.11994	53.632	80.835
<i>2. Kontrolle</i>	Insgesamt	60.509	10.189	.16839	44.802	81.808
	Placebo	59.707	8.8345	.14796	48.793	76.025
	B	59.442	10.093	.16979	47.839	77.090
	C	62.378	12.197	.19554	44.802	81.808

Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen im Hinblick auf die Erkrankungsdauer

Der Einfluss der Erkrankungsdauer wurde in Form einer zweifaktoriellen Varianzanalyse in Zusammenhang mit den Werten der Differenzanalyse (Differenzwerte) erfasst. Bei der Analyse der Standardabweichung und des MQA zeigte die Erkrankungsdauer bezüglich der Messwerte Fibrillenumfang, Fibrillenfläche und Fibrillendurchmesser einen signifikanten Einfluss. Zwischen den einzelnen Therapiegruppen lässt sich dabei kein Unterschied festmachen. Der Median und der Mittelwert der 3 erfassten Parameter waren von der Erkrankungsdauer nicht signifikant beeinflusst.

In folgender Tabelle werden die negativen Steigungen der Variablen SD und MQA der Fibrillenfläche, des Fibrillenumfangs und des Fibrillendurchmessers dargestellt. Die Variablen nehmen mit zunehmender Erkrankungsdauer um den jeweiligen Faktor pro Zeiteinheit ab. Demzufolge zeigten Pferde mit lang bestehenden, chronischen Fesselträgerschäden eine geringere SD und einen geringeren MQA in Bezug auf die erfassten Parameter. Sie stellen somit ein einheitlicheres Bild an Fibrillenquerschnitten dar. Ein abnehmender MQA zeigt dass 50% aller Beobachtungswerte in einem schmaleren Bereich liegen. Ebenso die Abnahme der SD besagt dass die Beobachtungswerte sich näher am Mittelwert aufhalten.

Tab. 11: Darstellung der negativen Steigungen (Faktoren pro Zeiteinheit) verschiedener Variablen der Differenzwertanalyse

	Faktor pro Zeiteinheit		
<i>Differenzwert</i>	<i>Gruppe A</i>	<i>Gruppe B</i>	<i>Gruppe C</i>
SD Fläche	-81,9149	-64,1693	-106,6239
MQA Fläche	-11,7545	-48,4762	-59,3715
SD Durchmesser	-0,4516	-0,398	-0,5132
MQA Durchmesser	-0,2036	-0,371	-0,4365
SD Umfang	-1,0038	-1,4256	-2,2176
MQA Umfang	-0,1286	-1,2463	-2,2349

In folgendem Abschnitt werden insgesamt 6 Pferde die zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung vor einem Monat oder weniger an eine Desmitis des Fesselträgers erkrankten aufgeführt werden. Aus Gruppe A (Placebo) handelt es sich um zwei Pferde mit Erkrankungsdauern von 2 und 4 Wochen. Gruppe B vertreten Pferde mit

Erkrankungsdauern von 2 und 3 Wochen. Aus Gruppe C werden 2 Pferde mit Erkrankungsdauern von 4 Wochen aufgeführt.

Die Darstellung der Erkrankungszeiträume von 2 und 24 Wochen werden mit entsprechenden Pferden ohne Berücksichtigung ihrer Therapiegruppe dargestellt.

Da die Gruppengröße von 2-4 Pferden keine statistische Aussage zulässt werden die Ergebnisse rein deskriptiv behandelt.

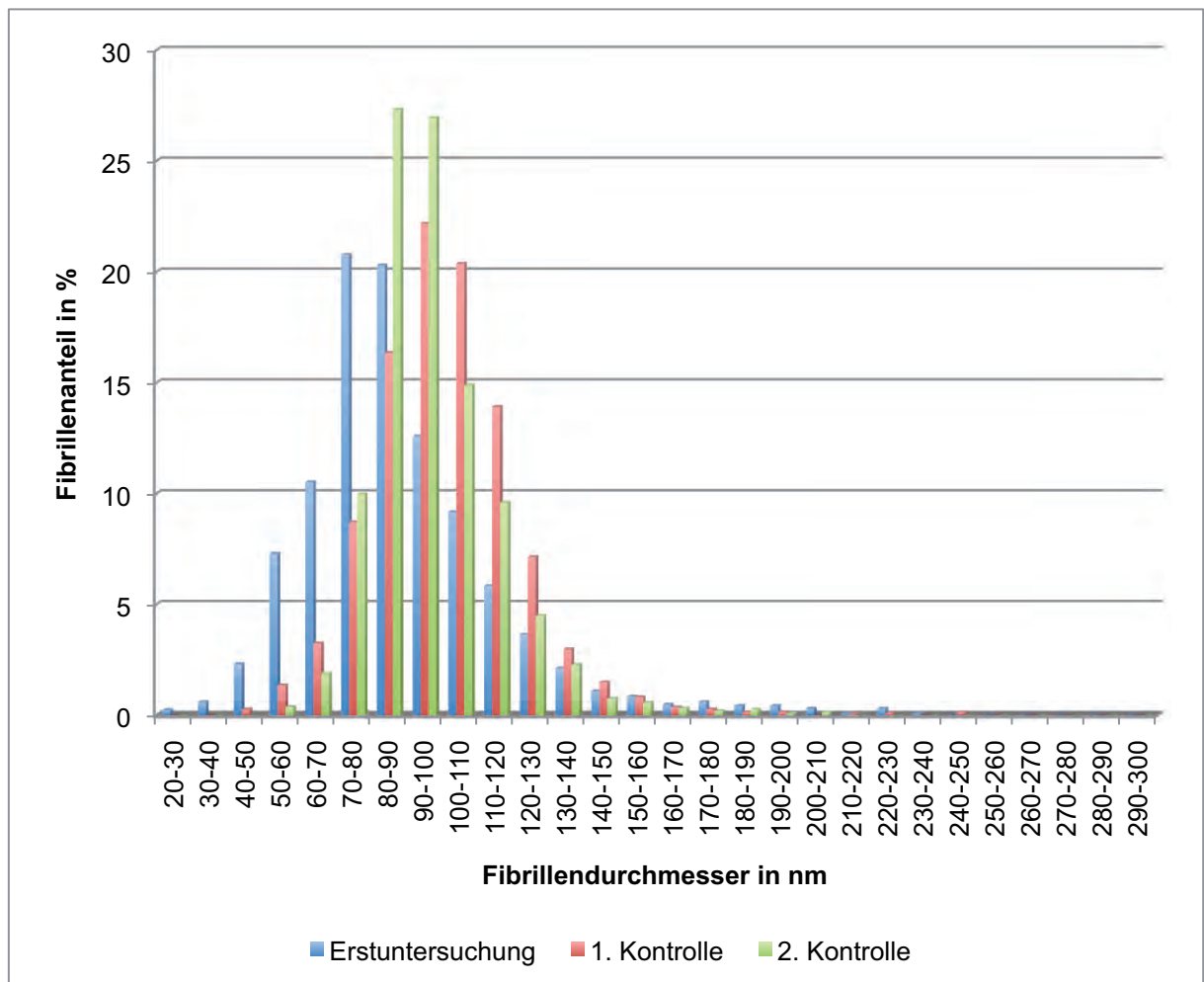


Abb. 17: 2 Pferde aus Gruppe A mit 0,5 und 1 Monat Erkrankungsdauer

Bei der Betrachtung der beiden Pferde aus Gruppe A mit Erkrankungsdauern von 0,5 und einem Monat zeigt sich deutlich ein höhere Anteil kleiner Fibrillen im Bereich von >80nm Durchmesser zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung. Im Laufe der 1. Kontrolle zeigt sich der höchste Anteil an Fibrillen im Bereich von 100-150nm Durchmesser. Fibrillen der Größenordnung 80-100nm dominieren zum Zeitpunkt der 2. Kontrolluntersuchung.

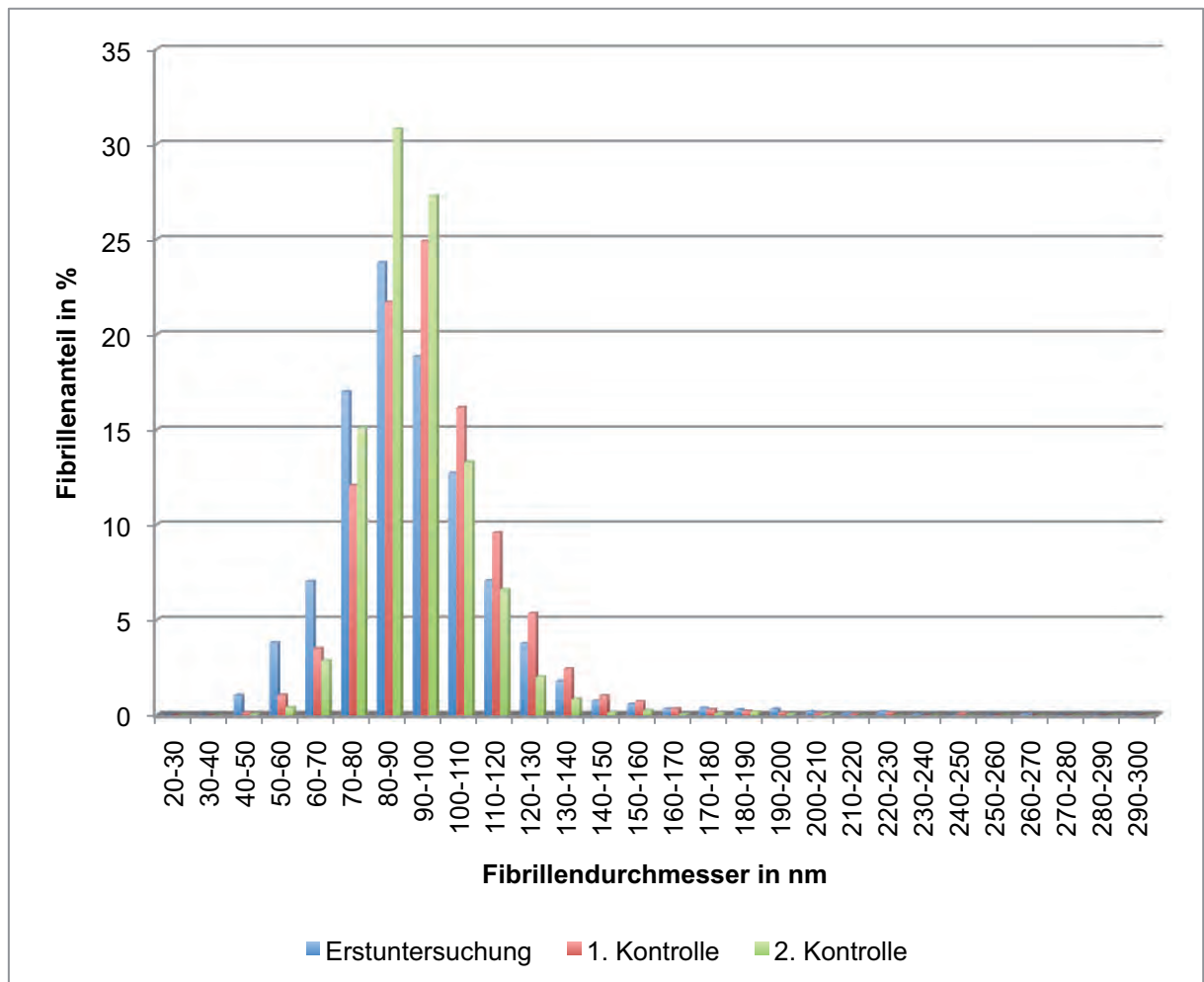


Abb. 18: 2 Pferde aus Gruppe B mit 0,75 und 1 Monat Erkrankungsdauer

In Gruppe B zeigt sich bei den 2 untersuchten Pferden mit 0,75 und 1 Monat Erkrankungsdauer ebenfalls ein höherer Anteil dünner Fibrillen (<80nm) zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung. Das Verteilungsbild der Fibrillen ähnelt sehr dem aus Gruppe A. Zum Zeitpunkt der 1. Kontrolle zeigen sich höhere Fibrillenanteile im Bereich von 100-150nm. Zum Zeitpunkt der 2. Kontrolle zeigen sich höhere Fibrillenanteile im mittleren Bereich von 20-100nm.

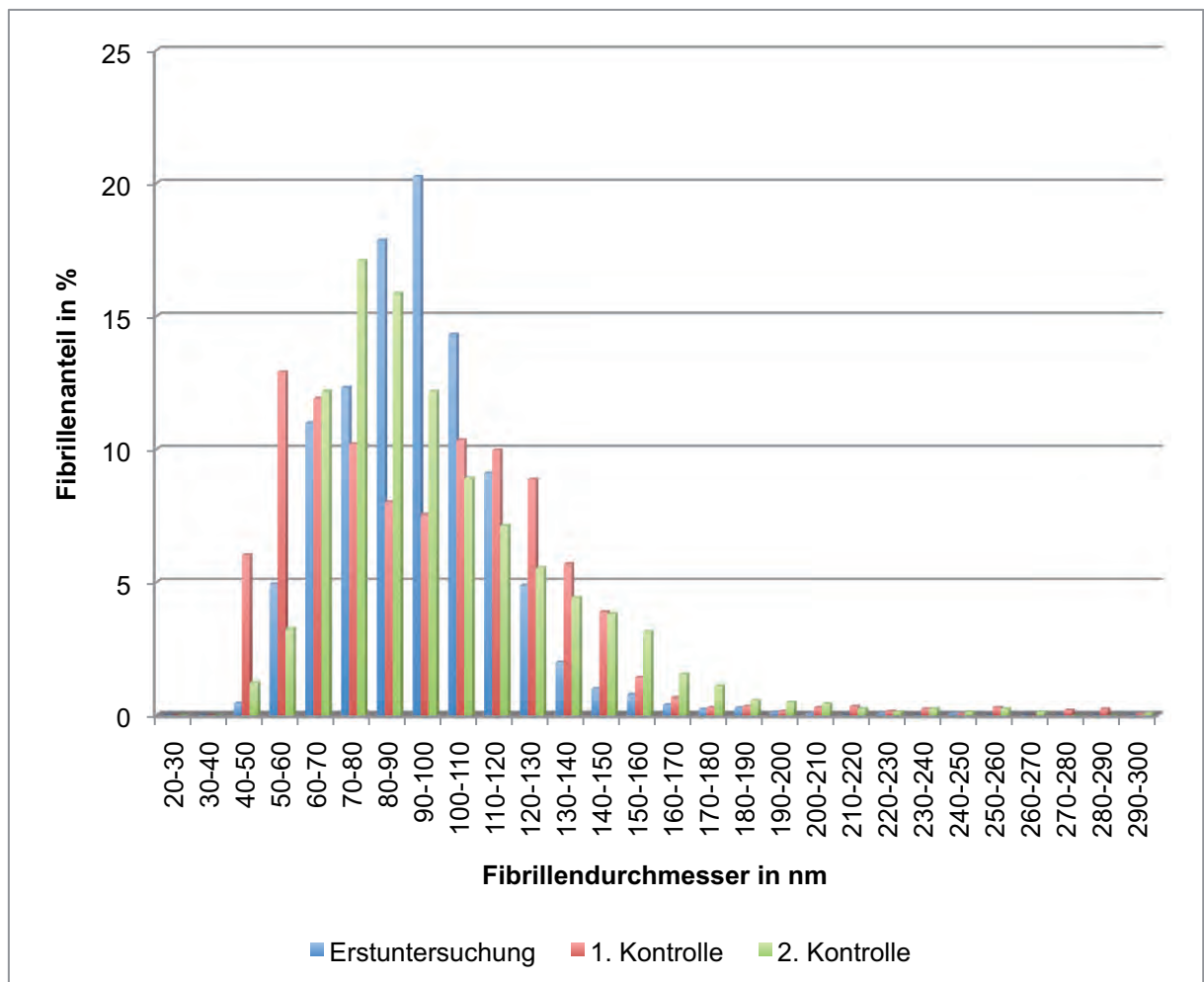


Abb. 19: 2 Pferde aus Gruppe C mit 1 Monat Erkrankungsdauer

In Gruppe C zeigt sich bei 2 Pferden mit 1 Monat Erkrankungsdauer ein unterschiedliches Bild im Vergleich zu den Gruppen A und B. Kleine Fibrillen (>60nm) sind zum Zeitpunkt der 1. Kontrolle am häufigsten. Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung überwiegen vor allem Fibrillen mit Durchmessern von 80-110nm. Besonders große Fibrillen (150-210nm) haben ihren größten Anteil zum Zeitpunkt der 2. Kontrolle.

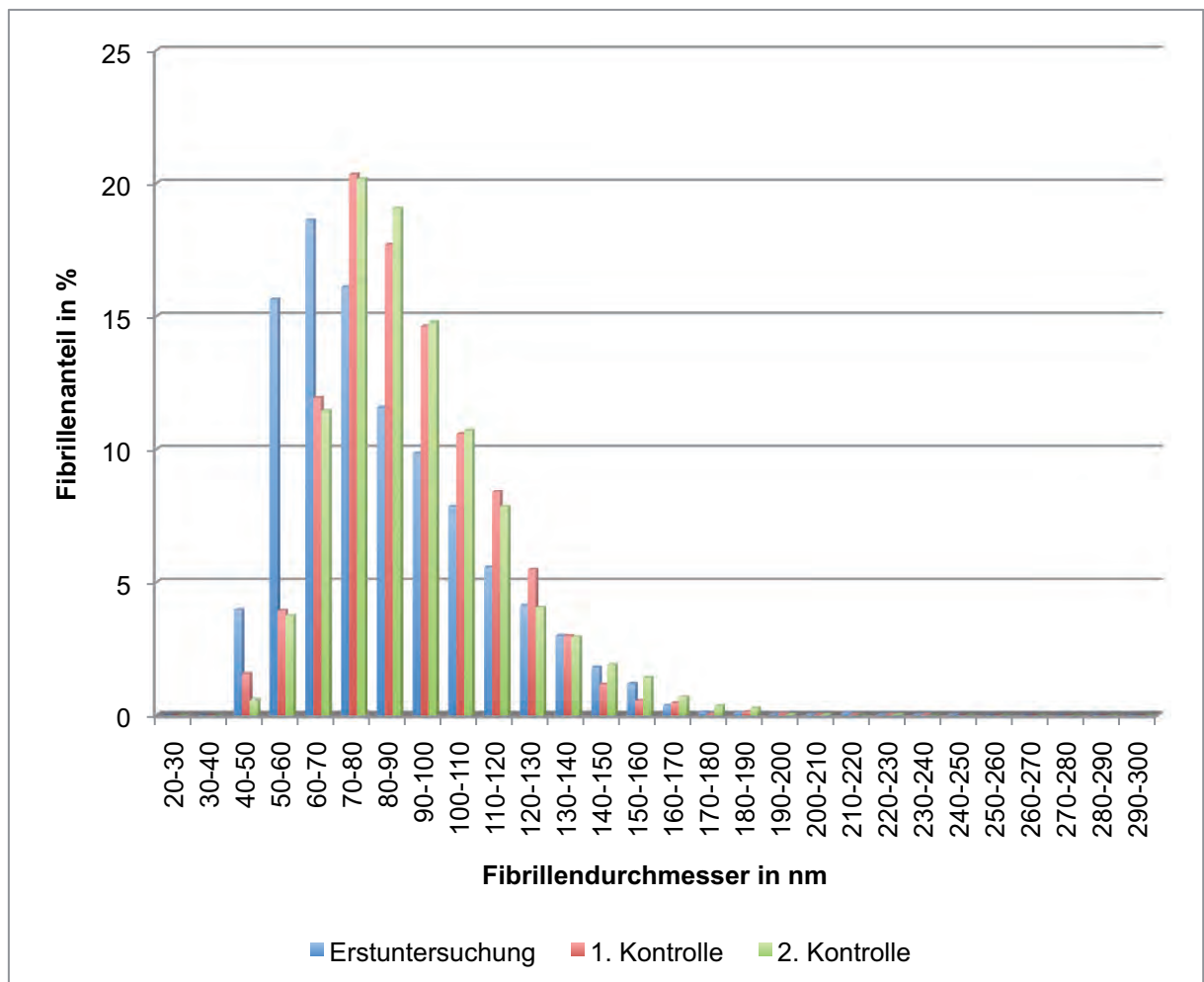


Abb. 20: 4 Pferde mit 24 Monaten Erkrankungsdauer aus den Gruppen A, B und C (2 Pferde)

Bei den insgesamt 4 Pferden mit Erkrankungsdauern von 24 Monaten aus allen drei Therapiegruppen zeigt sich ein deutlich höherer Anteil dünner Fibrillen (<70nm) zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung. Die beiden Kontrolluntersuchungszeitpunkte unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander.

8.3.2 Ergebnisse des ultrastrukturellen Vergleichs der erkrankten Fesselträger mit denen gesunder Pferde

Die erfasste Ultrastruktur der Fesselträger der Studienpferde wurde abschließend mit den Ergebnissen der vorangegangenen gleichermaßen verlaufenen Studie an Schlachtpferdebeinen verglichen. Die Methode der Elektronenmikroskopie wurde bei den makroskopisch unauffälligen Fesselträgern der Schlachtpferde nach gleichem

Vorgehen dieser Studie durchgeführt. Insgesamt wurden aus den 8 verschiedenen Lokalisationen (Einteilung identisch zur klinischen Studie) pro Pferdebein je eine Gewebeprobe analysiert. Die Ergebnisse der beiden Studien wurden anhand ihrer Lokalisation miteinander verglichen. Von den Studienpferden der klinischen Studie wurden die Ergebnisse der Erstuntersuchung mit den Ergebnissen der Schlachtpferdeuntersuchung verglichen. Bei der statistischen Analyse der Signifikanzen wurde auf das Studienpferd welches an Lokalisation 4 erkrankte verzichtet, da es sich um das einzige Pferd dieser Lokalisation handelt. Dieser Einzelfall hätte weniger Aussagekraft als die Ergebnisse der Lokalisationen 1-3 und 7-8, welche bei mehreren Pferden betroffen waren.

Tab. 12: Darstellung der Signifikanzen im Vergleich der Ergebnisse aus Teil II und Teil III der Gesamtstudie. Rot = signifikant, Blau = Trend, grenzwertige Signifikanz

Lokalisationen:		Lok. 1	Lok. 2	Lok. 3	Lok. 7	Lok. 8
Fibrillenfläche	MW	0,34	0,88	0,23	0,31	0,021
	Med	0,058	0,051	0,051	0,0086	0,020
	SA	<0,0001	0,0078	0,52	0,0003	<0,0001
	MQA	0,057	0,82	0,43	0,21	0,0078
Fibrillendurchmesser	MW	0,94	0,44	0,13	0,81	0,14
	Med	0,18	0,063	0,069	0,090	0,18
	SA	<0,0001	0,0083	0,30	0,0003	<0,0001
	MQA	0,001	0,23	0,70	0,023	0,0004
Fibrillenumfang	MW	0,52	0,33	0,42	0,85	0,20
	Med	0,073	0,0078	0,046	0,043	0,12
	SA	<0,0001	0,016	0,48	0,0008	<0,0001
	MQA	0,010	0,96	0,98	0,067	0,0024
Fibrillendichte	MW	0,12	0,77	0,22	0,41	0,0014
Fibrillenanteil in %	MW	0,40	0,59	0,29	0,30	0,44

Fibrillenfläche

Die Fibrillenflächen der Studienpferde unterscheiden sich in ihren Medianen signifikant in den Lokalisation 2, 3, 7 und 8. Lokalisation 1 weist in ihren Medianen einen Trend zur Signifikanz auf. Die Mittelwerte der Fibrillenflächen weisen lediglich in einer Lokalisation (Lok. 8) einen signifikanten Unterschied auf. Die Standardabweichung der Fibrillenfläche der erkrankten Studienpferde unterscheidet sich in den Lokalisationen 1, 2, 7 und 8 signifikant von den Werten gesunder Pferde.

Bezüglich des mittleren Quartilsabstands lässt sich ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen in Lokalisation 1 und 8 feststellen.

Fibrillendurchmesser

Die Mittelwerte der analysierten Fibrillendurchmesser weisen in keiner der Lokalisationen einen signifikanten Unterschied auf. Hinsichtlich ihrer Mediane zeigt sich ein signifikanter Unterschied beider Gruppen in den Lokalisationen 2 und 3.

Die Standardabweichung unterscheidet sich signifikant in der Lokalisationen 1, 2, 7 und 8, ebenso der mittlere Quartilsabstand, ausgenommen in Lokalisation 2.

Fibrillenumfang

In Bezug auf die errechneten Mittelwerte des Kollagenfibrillenumfangs gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den erkrankten und den gesunden Pferdesehnen. Die Mediane hingegen unterscheiden sich signifikant im Bereich der Lokalisationen 2, 3 und 7, ebenso die Standardabweichung zuzüglich bei Lokalisation 8. Der mittlere Quartilsabstand zeigt in den Lokalisationen 1 und 8 einen signifikanten Unterschied beider Gruppen sowie einen Trend zur Signifikanz in Lokalisation 7.

Fibrillendichte

Die Fibrillendichte weist allein in Lokalisation 8 einen signifikanten Unterschied beider Gruppen auf.

Fibrillenanteil in %

Der Fibrillenanteil in % weist keinerlei signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die angewandte Methode und die statistisch erfassbaren Ergebnisse lassen zusammenfassend keinen ultrastrukturellen Unterschied der erkrankten Bereiche des M. interosseus medius der Studienpferde der drei Therapiegruppen erkennen. Auch hinsichtlich der drei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte gibt es keinen, die analysierte Kollagenfibrillenstruktur betreffenden, signifikanten Unterschied. Die

Differenzanalyse spiegelt dieses Ergebnis ebenfalls wider. Aus der vorangegangenen klinischen Studie wurde der Lahmheitsgrad und der das Gewebe charakterisierende Score-Wert, ermittelt im Zuge der sonographischen Untersuchung, aufgegriffen und statistisch mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchung verglichen. Beide Werte weisen keinen Einfluss auf das erfasste ultrastrukturelle Erscheinungsbild der erkrankten Bereiche der Sehnen auf.

Die Erkrankungsdauer der Patienten zeigt jedoch in Bezug auf die Werte der Standardabweichung und der mittleren Quartilsabstände einen signifikanten Einfluss auf den erfassten ultrastrukturellen Gewebeaufbau. Pferde mit lang anhaltender Erkrankung des M. interosseus medius zeigen eine Abnahme der Werte der SA und des MQA in Bezug auf die Messparameter Fibrillenfläche, Fibrillendurchmesser und Fibrillenumfang. Diese Erscheinung ist nicht gruppenspezifisch sondern bezieht sich gruppenunabhängig auf alle Studienpferde. Zusammenfassend bleibt diese Erscheinung der einzig signifikante Einflussfaktor.

Im Vergleich der erkrankten Fesselträgerbiopsien der Studienpferde zu den gesunden Sehnenproben gewonnen von Schlachtpferden zeigt sich eine Vielzahl signifikanter Unterschiede. Vor allem im Bereich der Werte des Median und der Standardabweichung gibt es gehäuft signifikante Unterschiede.

Die Kenngrößen der Gesamtanzahl an Fibrillen und des Kollagengehalts (Fibrillenanteil in % und Fibrillendichte) weisen lediglich in einer Lokalisation einen Unterschied beider Gruppen auf. Zusammenfassend kann ein deutlicher Unterschied der Größenanordnung der einzelnen Fibrillen festgehalten werden. Hinweis darauf geben die Unterschiede der Mediane und der Standardabweichungen, welche eine unterschiedliche Anordnung der Fibrillen um den Mittelwert anzeigen. Auch die unterschiedliche Verteilung der Fibrillendurchmesser stützt diese Erkenntnis. Der deutlich höhere Anteil an Kollagenfibrillen mit Durchmessern von $>120\text{nm}$ ist hierbei besonders zu betonen. Am erkrankten Gewebe lässt sich jedoch im Vergleich zu gesundem Sehnenewebe kein Unterschied im Hinblick auf den Kollagengehalt an sich feststellen.

9. Diskussion

9.1 Zielsetzung

Die Erfassung der kollagenen Struktur des M. interosseus medius und sein Heilungsverhalten sind durch die ultrasonographische Bildgebung nur begrenzt möglich. Die Untersuchung auf ultrastruktureller Ebene mittels Elektronenmikroskopie stellt eine etablierte Möglichkeit dar, die Größe und Verteilung der Kollagenfibrillen darzustellen.

Ziel dieser Studie ist die Charakterisierung der kollagenen Struktur des erkrankten Gewebes des M. interosseus medius. Im Studienverlauf wurde zudem das Heilungsverhalten der Kollagenfibrillen über einen Zeitraum von 12 Wochen untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Studie war der Einfluss regenerativer Therapien (PRP, MSC) auf das Heilungsverhalten des M. interosseus medius. Dem Großteil der bisher veröffentlichten Studien über den therapeutischen Einsatz von PRP und MSC fehlt eine Kontrollgruppe, oder es handelt sich um künstlich gesetzte Sehnenläsionen. Im Anbetracht des häufigen Einsatzes beider Agenzien in der orthopädischen Pferdemedizin sind klinische Studien mit Kontrollgruppen erforderlich (Koch et al. 2009, Taylor et al. 2007). Aus diesem Grund wurde diese Studie als quantitative, prospektive Doppelblindstudie entworfen und umgesetzt.

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt bei der Analyse der kollagenen Struktur des erkrankten M. interosseus medius. Die vorangegangene Arbeit (Teil I) befasste sich mit der klinischen und ultrasonographischen Untersuchung der 30 Studienpferde. Eine detaillierte Darstellung der drei Therapiegruppen und der verwendeten Therapeutika sind der Vorgängerarbeit zu entnehmen (Banse 2011).

9.2 Kritik der Methode

9.2.1 Biopstatentnahme

Die Entnahme der Gewebeproben des Fesselträgers wurde zu jedem Zeitpunkt von derselben Person durchgeführt. Hilfestellung boten dabei zwei weitere Personen. Eine Hilfsperson befand sich am Kopf des Pferdes, eine weitere Person hielt die betroffene Gliedmaße gebeugt. Die Handhabung der Biopsienadel und die korrekte Einführung der Nadel in das Zielgewebe wurden im Vorfeld an Schlachtpferdebeinen geübt. Die Entnahme erfolgte jeweils direkt nach der ultrasonographischen Untersuchung. Der Untersucher führte die Biopsienadel blind in den erkrankten Bereich ein. Dies erforderte eine genaue Vorstellung der Lokalisation der Läsion. Ebenso musste durchdacht werden welche Gewebepartie in der Aussparung des Stilets zum liegen kommt und herausgetrennt wird. Da die Aussparung 3mm von der Spitze der Nadel entfernt war musste diese um die Distanz von 3mm über das erkrankte Gewebe hinaus geschoben werden. Die durchführende Person wies langjährige Erfahrung in der Diagnostik und Therapie von Sehnenerkrankungen beim Pferd auf. Fundierte anatomische Kenntnisse der untersuchten Region waren vorausgesetzt. Da es sich bei den vorhandenen Läsionen um Areale von mindestens 2 x 2 cm handelte konnte von einer sehr hohen Treffgenauigkeit des erkrankten Bereichs ausgegangen werden.

Beim Üben der Biopsieentnahme stellten sich zwei limitierende Faktoren heraus. Bereiche des M. interosseus medius welche dem Knochen (MC III, MT III) anliegen sind schwer zu beproben da die Biopsienadel auf den Knochen trifft und somit nicht weit genug in das Zielgewebe vorgeschoben werden kann. Die Aussparung der Biopsienadel kann also nicht bis in den knochennahen Randbereich vorgeschoben werden. Ebenfalls aus anatomischen Gründen nicht zu erreichende Areale waren die an die Griffelbeine angrenzenden Bereiche. Somit konnten im proximalen Abschnitt des Fesselträgers der laterale und der mediale Randbereich nicht durch die angewandte Methode beprobt werden. Für diese Studie stellten sich diese Faktoren jedoch zweitrangig dar. Die erkrankten Bereiche waren entsprechend groß und somit in jedem Fall mit dieser Methode gut zu erreichen.

Schmerzreaktionen in Form von Abwehrreaktionen fielen bei allen Eingriffen gering aus. Die Sedation mit 0,01 mg/kg Körpergewicht Detomidinhydrochlorid sowie die lokale Anästhesie von 2ml „Minocain 2%®“ als subkutanes Depot schien ausreichend. Bei im Vorfeld unruhigen Pferden wurde zusätzlich eine Oberlippennasenbremse zur Ruhigstellung verwendet. Die Gefahr der Verletzung der angrenzenden Strukturen wie die A. u. V. digitalis palmaris bzw. plantaris communis bleibt bei Abwehrreaktionen bestehen, kann jedoch durch verwendete Maßnahmen erheblich reduziert werden. Ähnliche Erfahrungen machte Wagels (2000) bei der Entnahme von Feinnadelbiopsien an der oberflächlichen und tiefen Beugesehne. In dieser Studie wurde das Biopstatentnahmegerät Manan „Pro-Mag 2.2“ verwendet. Es handelt sich dabei um eine nach Auslösen automatisch einstechende Kanüle mit Federmechanismus. Insgesamt bietet das Gerät eine einfache Handhabung. Einzig störend ist das Geräusch des Auslösemechanismus. Davon kann sich ein Pferd erschrecken und somit durch Abwehrbewegungen Verletzungen herbeiführen und die sachgemäße Biopstatentnahme verhindern. Die in dieser Studie verwendete „Biopsienadel 18 – G x 3“ der Firma Dispomed Witt oHg“ erwies sich als einfach in der Handhabung und gut platzierbar. Als problematisch anzusehen war jedoch ein mögliches Abbiegen der Nadel während der Biopstatentnahme. Dadurch kann es zur Entnahme nicht repräsentativen Gewebes kommen. Dieses Problem wurde bereits von anderen Autoren berichtet. Rühmann (1999) erhielt bei 11 von 58 gewonnenen Sehnenbiopsien Gewebe mit Haut- und Unterhautanteilen.

Das unterschiedliche Erscheinungsbild der Kollagenfibrillen der entnommenen Biopsien dieser Studie im Vergleich zu den Ergebnissen der Studie an unveränderten Schlachtpferdebeinen (Teil III der Gesamtstudie) lässt auf eine Probenentnahme in erkranktem Gewebe schließen. Insgesamt enthielten alle Gewebeproben Sehngewebe. Keine der entnommenen Proben enthielten Anteile anderen Gewebes (Haut, Unterhaut).

Die Blutungen im Anschluss an die Entnahme der Biopsien waren geringgradig und durch verletzte Hautgefäße verursacht. Keines der Studienpferde wies nach Biopstatentnahme eine anhaltende Schwellung oder eine Lahmheit, bzw. eine Verschlechterung der vorhandenen Lahmheit auf.

Die von Wagels (2000) etablierte Feinnadelbiopsie eines zentralen Gewebezyllinders aus der oberflächlichen und tiefen Beugesehne des Pferdes hat nach bisherigen Erkenntnissen keinen Einfluss auf die spätere Zugfestigkeit der Sehne und ist, wie

auch in dieser Studie, zu keinem Zeitpunkt ultrasonographisch nachweisbar (Buck 2003, Wagels 2000). Die von Wagels (2000) und Rühmann (1999) untersuchten histologische Veränderungen des biopsierten Sehnengewebes wurden als geringgradig eingestuft.

Im Fall dieser Studie wurde nach insgesamt 3maliger Biopsieentnahme im Abstand von 6 Wochen kein Hinweis auf ein darauf entstandenes Rezidiv festgestellt. Die Methode kann insgesamt, auch im Bereich des M. interosseus medius, als eine Methode mit geringem Risiko betrachtet werden.

Die wiederholte Einführung der Biopsienadel in das erkrankte Gewebe ähnelt in gewisser Weise der in der Vergangenheit praktizierten Methode des sog. *Splitting*. Bei diesem Eingriff wurden durch kleinere perkutane oder die ganze Sehne längs durchtrennende Inzisionen eine Aktivierung des Granulationsgewebes und eine vermehrte Gefäßeinsprossung induziert. Zudem verbessert Splitting die Kommunikation zwischen dem Zentrum der Sehne, der Peripherie und dem peritendinösen Gewebe (Henninger et al. 1992). Die Methode fand vor allem bei chronischen Sehnenleiden sowie Erkrankungen des Fesselträgers Anwendung (Knudsen 1976, Webbon 1979). Die meisten Pferde dieser Studie zeigten eine chronische Desmitis des M. interosseus medius. Eine Verbesserung der Heilung durch die 3malige Inzision durch die Biopsienadel wäre demnach nicht auszuschließen. Eine Aktivierung des chronischen Prozesses in Folge einer verbesserten Vaskularisierung ist möglicherweise mit verantwortlich für das Voranschreiten des Heilungsprozesses. Umso wichtiger erschien aus diesem Aspekt die Inzision und Applikation eines Placebos bei Gruppe A. Der mögliche heilungsfördernde Prozess könnte bei Verzicht auf jegliche Injektionen zu einer benachteiligten Heilung in der Placebogruppe führen, und somit zu falschen Ergebnissen. Die Verbesserung der klinischen und ultrasonographischen Untersuchung in Gruppe A bleibt in möglichem Zusammenhang mit dem beschriebenen Effekt der wiederholten Inzision der erkrankten Struktur.

Aber auch Gruppe C könnte von der Vorgehensweise profitiert haben. Da Stammzellen chemotaktisch in Gebiete mit hoher Stoffwechselaktivität und aktiven Umbauprozessen migrieren kann die wiederholte Biopsientnahme einen Behandlungserfolg mit MSC eventuell denkbar verbessern.

9.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie und Bildbearbeitung

Die Fixierung und Aufbereitung der Sehnengewebeproben erfolgte ohne Komplikationen nach einem etablierten Protokoll.

Die entwickelten Bilder waren von guter Qualität. Eine digitale Bildentwicklung stand im auswertenden Labor zum Zeitpunkt der Studie zur noch nicht zur Verfügung. Es gibt keine Anhaltspunkte für einen offensichtlichen Informationsverlust durch die analoge Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bilder mit anschließender Digitalisierung durch Scannen der Fotoabzüge.

Die Anwendung des Programms Image J stellte sich als einfach und übersichtlich dar. Es handelt sich dabei um ein automatisches quantitatives Verfahren. Um eine möglichst subjektive Darstellung der Ultrastruktur des Fesselträgers zu erzielen wurde Wert darauf gelegt, sich nicht auf Score-Werte zu beziehen, um den Einfluss der analysierenden Person zu unterbinden. Dies war auch wichtig da die vorangegangene Arbeit an Gewebeproben von Schlachtpferden nach der gleichen Methode untersucht wurde, jedoch von einer anderen Person.

Die Platzierung des Zählfensters wurde nach bestmöglicher Darstellung der Kollagenfibrillen im Querschnitt gewählt. Dabei konnte bei annähernd gleich gut geeigneten Arealen der Bereich frei gewählt werden. Im Einzelfall schließt dies nicht aus, dass eine gewisse Präferenz einer Fläche mit dichter gelagerten Fibrillen zugewiesen wurde. Dies geschah auch unter dem Aspekt, möglichst artefaktfreies Gewebe darzustellen. Aufgelockerte Kollagenfibrillen könnten auch durch die Aufarbeitung und das Schneiden im Vorfeld der Mikroskopie entstanden sein.

Die weitere Verarbeitung der Bilder, sowie die Erhöhung des Kontrastes wurden individuell der Bildqualität angepasst. Bei ausreichend kontrastierten Fotos wurde darauf verzichtet.

Die Bildschärfe und der Schwarz-Weiß-Kontrast (Fibrillen, Nicht-Fibrillen) waren insgesamt bei fast allen erstellten Bildern von guter Qualität. Von den 360 entwickelten Bildern waren insgesamt 335 Bilder (93%) auswertbar. Bei den nicht verwendbaren Bildern waren mangelnder Kontrast und ungenügende Bildschärfe die Kriterien, welche es dem Programm nicht ermöglichten, die einzelnen Fibrillen zu identifizieren und voneinander abzugrenzen. In einigen Fällen waren auch keine

Fibrillen im Querschnitt zu finden oder nur vereinzelt d.h. ein entsprechendes Zählfenster lies sich nicht finden.

Das erstellte Binary-Bild entsprach ebenfalls unterschiedlicher Qualität entsprechend der Bildschärfe und des Kontrasts des Originals. Geht man von einer Kreisfläche aus mit glatter Umrandung so ist deren Umfang deutlich kleiner als der Umfang einer Kreisfläche mit gezackter oder welliger Umfangslinie. Das gleiche gilt auch für Fibrillen die nicht direkt im Querschnitt angeschnitten wurden und sich somit als Ellipsen darstellen. Ihre Schnittfläche ist entsprechend größer als die exakte Querschnittsfläche. So konnten die errechneten Messwerte wie der Fibrillenumfang und die Fibrillenfläche entsprechend abweichen. Diese Unterschiede zeigen sich auch bei den Ergebnissen dieser Studie. So lassen sich eventuell signifikante Unterschiede des Fibrillenumfangs, nicht aber der Fibrillendurchmesser, erklären.

Bei der Messung des Fibrillendurchmessers wurde der kleinste Durchmesser gewählt. Dieser Messwert lässt sich am geringsten von den genannten Problemen wie Bildschärfe- und Kontrast, sowie wellenförmige Umfangslinien und schräg angeschnittenen Fibrillen, beeinflussen. Aus diesem Grund wurde auf die Verteilung der Fibrillen unterschiedlichen Durchmessers genauer eingegangen.

Im Vergleich zur Betrachtung von Sehnengewebe mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie bleibt die Transmissionselektronenmikroskopie auf eine Ebene zur Ansicht beschränkt. Die von Buck (2003) durchgeführten Untersuchungen an gesunden und erkrankten Pferdesehnen mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie erwiesen den Vorteil der Charakterisierung der Fibrillenausrichtung. Ein eigens dafür entwickeltes Score-System beschrieb dabei die Faktoren Fibrillendichte, Fibrillenparallelität und Fibrillenlinearität zusammengefasst als Fibrillentexturzahl. Trotz der Anhaltspunkte aus Literatur und Vergleichsprojektionen gesunder Pferdesehnen bleibt die Gefahr des subjektiven Einflusses bei dieser Art der Bewertung bestehen.

9.3 Patientengut

Bei den Studienpferden handelte es sich um Pferde unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Nutzung. Den Schwerpunkt bildeten jedoch Dressurpferde (50%) und Pferde der Rasse Deutsches Warmblut (93%). Dieses Erscheinungsbild deckt sich mit den Angaben der Literatur bezüglich der Erkrankung aller Altersklassen und

dem vermehrten Auftreten von Desmitiden des M. interosseus medius beim Dressurpferd (Dyson u. Genovese 2002). Auch die häufiger betroffene Lokalisation an der Hintergliedmaße der Pferde dieser Studie (70%) stellt speziell beschrieben bei Dressurpferden eine gesonderte Rolle. Die gewünschte Lastaufnahme der Hinterhand bei Lektionen der oberen Klassen fordert eine vermehrte Belastung der Sehnen- und Bandstrukturen der hinteren, distalen Gliedmaße (Dyson u. Genovese 2002, Schulze u. Budras 2008). Erkrankungen dieser Art sind aus klinischer Erfahrung und deckender Angaben in der Literatur von schlechterer Prognose und längerer Heilungsdauer als Erkrankungen des Fesseltrageapparates an der Vordergliedmaße (Dyson 1994, Dyson et al. 1995, Lischer et al. 2006, Rijkenhuizen et al. 2007).

Auch zu beobachten war das vermehrte Auftreten von Fehlstellungen der Gliedmaße bei den Pferden dieser Studie. 23 Pferde des Gesamtkollektivs zeigte bei der klinischen Untersuchung eine Fehlstellung der erkrankten Gliedmaße oder mehreren Gliedmaßen. Dies lässt die beschriebene Vermutung eines prädisponierenden Zusammenhangs zwischen Fehlstellungen und Exterieurmängeln mit einer Erkrankung des M. interosseus medius (Dyson et al. 1995, Dyson u. Genovese 2002, Moyer u. Raker 1980, Smith et al. 2002) auch in dieser Studie nachvollziehen.

9.3.1 Dauer der Erkrankung

Ziel dieser klinischen Studie war die Heilung auf natürlichem Wege entstandene Erkrankungen des Fesselträgers des Pferdes und deren Heilung zu analysieren. Dabei wurde kein Unterschied zwischen akuten und chronischen Erkrankungen gemacht. Wie bereits im Kapitel der Therapie von Fesselträgererkrankungen besprochen, bleibt die Frage des optimalen Zeitraumes der Injektion der Therapeutika (PRP und MSC) bestehen. Der Ideale Zeitpunkt hierfür wurde noch nicht ausreichend belegt (Smith et al. 2003, Dahlgren 2009). Die Behandlung mit PRP wird von vielen Autoren im Akutstadium aufgrund ihrer direkten antiinflammatorischen Wirkung empfohlen (Argüelles et al. 2008, Bosch et al. 2010a, 2011b). Von einigen Autoren wird sogar die mehrmalige Applikation von PRP von 2-3 mal im Abstand von 2 Wochen empfohlen (Argüelles et al. 2008, Ionita 2010). Für MSC wird ein optimales Zeitfenster von 2-3 Wochen ab ca. einer Woche nach Erkrankung gesehen (Dahlgren 2009, Lacitignola et al. 2008, Smith u. Webbon

2005). In dieser Phase ist die initiale Entzündung und Einblutung abgeklungen und es wird angenommen dass ein Granulationsbett mit adäquater Angiogenese das Überleben der implantierten Zellen optimiert (Smith et al. 2003). Zudem tragen in dieser Phase vorhandene Wachstumsfaktoren ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Proliferation und der Aufrechterhaltung des Differenzierungspotentials der MSC (Colleoni et al. 2009). Bei der Behandlung zu einem späteren Zeitpunkt wird vermutet dass bereits gebildetes Narbengewebe die erwünschte therapeutische Wirkung der Zellen nicht zulässt (Fortier u. Smith 2008). Bei den Erkrankungen des Fesselträgers der Pferde dieser Studie handelt es sich zum Großteil um chronische Erkrankungen. 6 der 30 Pferde haben eine Erkrankungsdauer von 4 Wochen oder weniger. Dieses Erscheinungsbild hat unterschiedliche Ursachen. Erfahrungen aus der Praxis zeigen dass die konkrete Diagnose eines Fesselträgerschadens oft nicht bei erstmaligem Auftreten einer damit verbundenen Lahmheit gestellt wird. Häufig vergehen Wochen mit vorangegangenen konservativen Therapien durch entzündungshemmende Medikation und Boxenruhe. Erst bei anhaltender Lahmheit werden weitere diagnostische Schritte eingeleitet. Die Entscheidung für eine Therapie mit MSC folgt in vielen Fällen ebenfalls verzögert. Zu berücksichtigen bleibt auch die unterschiedliche Pathogenese der einzelnen Läsionen. Kommt es durch wiederholte Überbelastung zu fibrillären Mikroläsionen im Gewebe des Fesselträgers und werden diese durch weitere Belastung zu größeren Schäden, zeigt das Pferd unter Umständen eine wechselnde Lahmheit. Die erschwerte Diagnostik und die verspätete Diagnosestellung machen es daher in der Praxis oft unmöglich eine regenerative Therapie im akuten Stadium der Erkrankung einzuleiten. Der weit verbreitete Einsatz von PRP und MSC bei Erkrankungen unterschiedlicher Stadien (akut und chronisch) gab Anlass auch chronisch erkrankte Pferde in die Studie aufzunehmen. Für folgende klinische Studien in größerem Umfang bleibt jedoch das Ziel vergleichbare akute Fesselträgererkrankungen und die Wirksamkeit deren Therapien zu untersuchen.

9.3.2 Betroffene Lokalisation und Gliedmaße

In dieser Studie litten 11 Pferde an einer Erkrankung im proximalen Teil des Fesselträgers. 9 Pferde davon an der Hintergliedmaße. Wie in vorangegangenen Studien beschrieben fällt die Prognose der Erkrankung dieses Abschnitts des

Fesselträgers oft schlechter aus als bei selber Erscheinung an der Vordergliedmaße (Dyson et al. 1995). Verantwortlich dafür ist die straffe Fascia plantaris. Diese spannt sich an beiden Griffelbeinen heftend über den Fesselträgerursprung (Lempe 2007, Lischer et al. 2006, Wissdorf et al. 2002). Bei 7 der 9 Pferde handelte es sich um eine langwierige chronische Erkrankung von 6 Monaten und länger. Die beiden restlichen Pferde erkrankten 2 und 4 Wochen vor Studienbeginn. Aus dieser Gruppe zeigten insgesamt alle Pferde eine Verbesserung der Gewebestruktur bei der ultrasonographischen Untersuchung. Die Lahmheit verbesserte sich bei 8 von 9 Pferden, jedoch erlangten nur 2 Pferde eine lahmfreie Bewegung zum Zeitpunkt der 2. Kontrolluntersuchung. Bei diesen Pferden handelte es sich um ein akut erkranktes Pferd mit einer Erkrankungsdauer von 2 Wochen sowie ein chronisch erkranktes Pferd mit einer Erkrankungsdauer von 26 Wochen. Ein Pferd mit einer Läsion im proximalen Bereich des Fesselträgers blieb die gesamte Studie über klinisch lahmfrei. Dieses Ergebnis schließt sich den Erkenntnissen der Literatur an. Insbesondere Ursprungsdesmopathien können diskontinuierlich sein und durch Ruhepausen verschwinden, oder lediglich unter dem Reiter, bei Ausführung vermehrt belastender Lektionen, erkennbar sein (Lischer et al. 2006).

Der mittlere Bereich des M. interosseus medius als erkrankter Bereich trat in dieser Studie nur bei einem Pferd auf. Wie auch in der Literatur beschrieben treten diese Art von Erkrankungen deutlich weniger häufig auf als eine Erkrankung der proximalen und distalen Bereiche des Fesselträgers (Dyson u. Genovese 2002, Dyson et al. 1995, Moyer u. Raker 1980).

Am häufigsten von Erkrankungen betroffen waren in dieser Studie die Fesselträgerschenkel bei 18 von 30 Studienpferden (60%). Unter diesen Pferden zeigte sich der laterale Fesselträgerschenkel der Hintergliedmaße als am häufigsten betroffene Struktur (30% der Gesamtstudienpferde). Bei allen Pferden handelte es sich um eine einseitige Schenkeldesmitis des M. interosseus medius.

9.4 Diskussion der Ergebnisse

Aufgrund der Datenmenge der insgesamt 96.687 vermessenen Fibrillen wurden die gesamten statistischen Tests mit folgenden zusammenfassenden Parametern pro ausgewertetem Bild berechnet: Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median und mittlerer Quartilsabstand (MQA). Der mittlere Quartilsabstand wurde bewusst

gewählt um die Aufteilung der Fibrillen im Bereich von besonders dicken ($>120\text{nm}$) oder besonders dünnen ($<80\text{nm}$) Fibrillen zu erfassen. Die Verwendung des Median und des Mittelwertes in Kombination verfolgte ebenfalls das Ziel eine möglichst genaue Charakterisierung der Fibrillenanordnung zu erhalten. Zur Veranschaulichung und graphischen Darstellung wurde die Unterteilung der Fibrillendurchmesser in 10er Schritten gewählt. Dabei konnte der prozentuale Anteil von Fibrillen unterschiedlicher Durchmesser betrachtet und verglichen werden.

Bei der Prüfung auf statistische Signifikanz zeigte sich bei allen erhobenen Parametern kein Unterschied zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten und den drei Therapiegruppen.

Die Kollagenfibrillen wiesen im Median Durchmesser zwischen ca. 66 und 185nm und Querschnittsflächen von 1.957 bis 17.284 nm² auf. Die Fibrillenverteilung zeigte jeweils den größten Anteil der Fibrillen im Bereich von $<80\text{nm}$ bis 100nm. Diese beiden Gruppen bildeten zusammen über 65% der Fibrillen. Der kleinste Anteil an Fibrillen befand sich im Bereich der Fibrillen mit Durchmessern von $<120\text{nm}$ (ca. 8 bis 17% der Fibrillen). Die verbleibende Gruppe der Fibrillen mit Durchmessern von 100-120nm hielt sich im Bereich der Größenordnung von 16 bis 22% der Gesamtfibrillen auf.

Trotz der fehlenden signifikanten Unterschiede konnten dennoch einige Beobachtungen festgehalten werden. Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung zeigt sich vermehrt ein höherer Anteil dünner Fibrillen im Vergleich zu den Kontrollzeitpunkten. Besonders deutlich zu erkennen war dies bei den akut erkrankten Studienpferden aus Gruppe A und B. Im Bereich von Fibrillen mit Durchmessern von $<80\text{nm}$ liegen zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung deutlich mehr Fibrillen als zu den Zeitpunkten der Kontrolluntersuchungen. Dieses Erscheinungsbild zeigte sich auch bei den 4 Pferden aus allen drei Therapiegruppen mit einer Erkrankungsdauer von 24 Monaten. Bei diesen Pferden lies sich ein ggr. höherer Anteil an Fibrillen mit Durchmessern von $<70\text{nm}$ beobachten. Umgekehrt sind im Bereich dickerer Fibrillen die Anteile im Laufe der Kontrolluntersuchungen höher als bei der Erstuntersuchung. Die beiden Kontrolluntersuchungen unterscheiden sich weniger deutlich voneinander. In Gruppe A und B (gesamt und akut erkrankte Pferde) stellt sich ein höherer Anteil an Fibrillen der Größenordnung von 100-140nm zum Zeitpunkt der ersten Kontrolle dar im Vergleich zum Zeitpunkt der 2. Kontrolle. In Gruppe C bilden

Fibrillen im Bereich von 80-90nm zum Zeitpunkt der 1. Kontrolle den höchsten Anteil im Vergleich zu den beiden anderen Untersuchungszeitpunkten.

Als weitere Beobachtung konnte festgehalten werden, dass in den Therapiegruppen B und C ein geringfügig höherer Anteil besonders dicker Fibrillen zu finden ist. Fibrillen mit Durchmessern von 140-170nm sind in diesen beiden Gruppen vermehrt vorhanden im Vergleich zu Gruppe A. In beiden Therapiegruppen B und C überwiegt in diesem Bereich zudem der Fibrillenanteil der 2. Kontrolluntersuchung den Anteil der ersten beiden Untersuchungszeitpunkte. Diese Beobachtungen lassen in gewissem Maße auf einen möglichen, wenn auch in dieser Studie nicht signifikanten, Einfluss der verwendeten Therapeutika (PRP und MSC) schließen. Möglicherweise lässt sich durch die Injektion von MSC oder PRP eine verbesserte Heilung durch die Bildung von Kollagenfibrillen von Durchmessern von >140nm erzeugen. Ein denkbarer limitierender Faktor der möglicherweise die Erfassung signifikanter Unterschiede unterbunden hat ist die Gruppengröße von 10 Pferden. Bei der Betrachtung einer größeren Anzahl an Patienten läge die Wahrscheinlichkeit höher Unterschiede der untersuchten Ultrastruktur statistisch zu verifizieren. Zur genaueren Erfassung sind Folgestudien in entsprechend größerem Umfang notwendig.

Um einen direkten Vergleich mit gesundem Gewebe des M. interosseus medius durchzuführen wurde vor diesem Teil der Gesamtstudie eine Untersuchung nach gleicher Methode an klinisch gesunden Gliedmassen von Schlachtpferden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dann entsprechend ihrer Lokalisation mit den Ergebnissen der Erstuntersuchung dieser Studie verglichen. Insgesamt wurden die drei proximalen Lokalisationen und die beiden Fesselträgerschenkel verglichen. Das im Bereich des Fesselträgerkörpers erkrankte Pferd wurde aus der Vergleichsstudie ausgeschlossen. Die Ergebnisse ergaben signifikante Unterschiede der SA des Fibrillendurchmesser, der Fibrillenfläche, und des Fibrillenumfangs bei 4 der 5 Lokalisationen. Ebenfalls signifikante Unterschiede zeigten die Werte des Median der Fibrillenfläche bei 4 der 5 Lokalisationen. Die 5. Lokalisation zeigte einen Trend zur Signifikanz. Weiter zu nennen ist der signifikant unterschiedliche MQA in Bezug auf die Fibrillendurchmesser bei Lokalisation 1, 7 und 8. Ein signifikanter Unterschied der Lage des Median bedeutet eine unterschiedliche Verteilung der Beobachtungswerte. Die zusätzliche Signifikanz der Darstellung der MQA und der SD untermauern diese Erscheinung. Die Beobachtungswerte liegen somit anders um den Mittelwert und um

den Median verteilt. Die Fibrillen liegen demnach in erkranktem Gewebe in unterschiedlichen Anteilen in den einzelnen Größenordnungen vor im Vergleich zu gesundem Gewebe.

Die Beurteilung der Qualität der kollagenen Strukturen der Pferdesehen beruht auch in dieser Studie auf einer indirekten Einschätzung der einzelnen Fibrillen anhand des Fibrillendurchmessers. Die genaue Kollagentypisierung des Sehnengewebes des Pferdes ist aufgrund fehlender Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-spezifischer Antikörper nicht möglich. Spezifische immunhistochemische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen sind somit bisher nicht durchführbar (Buck 2003). Einige vorangegangene Studien benutzten polyklonale bovine Anti-Kollagen Typ I und III Antikörper (De Mattos Carvalho et al. 2011) zur Charakterisierung von equinem Sehnengewebe. Andere Autoren gehen davon aus, dass Fibrillen des Kollagentyp I beim Pferd mit Durchmessern von <80nm anzusiedeln sind. Diese Ergebnisse gehen aus Untersuchungen von unreifem Narbengewebe hervor (Becker et al. 2001, Goodship et al. 1994). Eine zeitgleiche elektronenmikroskopische Untersuchung und eine immunhistochemische bzw. biochemische Untersuchung sind bei der Größe des entnommenen Biopats der Feinnadelbiopsie, wie sie in dieser Studie Verwendung zeigte, nicht möglich. Die Charakterisierung der Fibrillen wurde in dieser Studie automatisiert quantitativ anhand ihrer gemessenen Parameter (Durchmesser, Querschnitts-Umfang, und Fläche) vorgenommen.

Wie bereits Parry et al. (1987a) feststellten steht die mechanische Belastbarkeit von Sehnen im Zusammenhang mit den Durchmessern ihrer Kollagenfibrillen. Das Vorhandensein von Fibrillen großer Durchmesser ermöglicht der Sehe größeren Kräften standzuhalten. Besonders im Fokus stand folglich auch in dieser Studie die Erfassung der möglicherweise vermehrten Bildung dicker Fibrillen mit Durchmessern von >120nm durch die Injektion von MSC oder PRP in erkranktes Sehnengewebe. Wie bereits beschrieben konnten Hinweise auf die Bildung dicker und damit höher belastbarer Fibrillen festgestellt werden. Bezüglich der Elastizität von Sehnengewebe zeigen Untersuchungen, dass größere Elastizität durch kleine Fibrillen und damit einen höheren Gehalt an gebundenen Proteoglykanen hervorgerufen wird (Franchi et al. 2007). Die interfibrilläre Gleitfähigkeit und damit die Geschmeidigkeit der Sehne werden PG und GAG zugeordnet. Ihr Anteil korreliert mit der vorhandenen

Fibrillenoberfläche und steigt demnach bei vermehrt dünnen Fibrillen an (Parry et al. 1987a, Rigozzi et al. 2010). Häufig wird nach Abklingen der Schmerzhaftigkeit und der Lahmheit der betroffenen Gliedmaße nach ausreichender Rehabilitationszeit eine verbleibende Schwellung des betroffenen Sehnenabschnitts beobachtet. Die Zunahme der Dicke der Sehne wird als Kompensation der reduzierten mechanischen Funktion des Narbengewebes betrachtet (Becker 1996).

Die in dieser Studie untersuchten Strukturen wurden im Prinzip auf einer Ebene betrachtet. Die Linearität der Fibrillenordnung in ihrem Verlauf entlang der Stresslinie lässt sich nicht beurteilen. Es bleibt so gesehen unklar wie sich die Fibrillenordnung beider Gewebe (erkrankt und gesund) voneinander unterscheiden. Studien belegten bisher dass selbst sich nach Abschluss der Reifungsphase (nach 120 Tagen) trotz Bildung dicker Fibrillen, die Fibrillenordnung in ihrem Verlauf noch deutlich von gesundem Sehnengewebe unterscheidet (Buck 2003). In dieser Studie lässt der Gesamteindruck der aufgenommenen Bilder auf eine häufige nicht parallele Ausrichtung der Kollagenfibrillen schließen. Als Beispiel werden hier zwei Aufnahmen dargestellt. Die rechte Aufnahme konnte nicht verwendet werden da sich kein Zählfenster mit auswertbaren Kollagenfibrillen im Querschnitt setzen ließ.

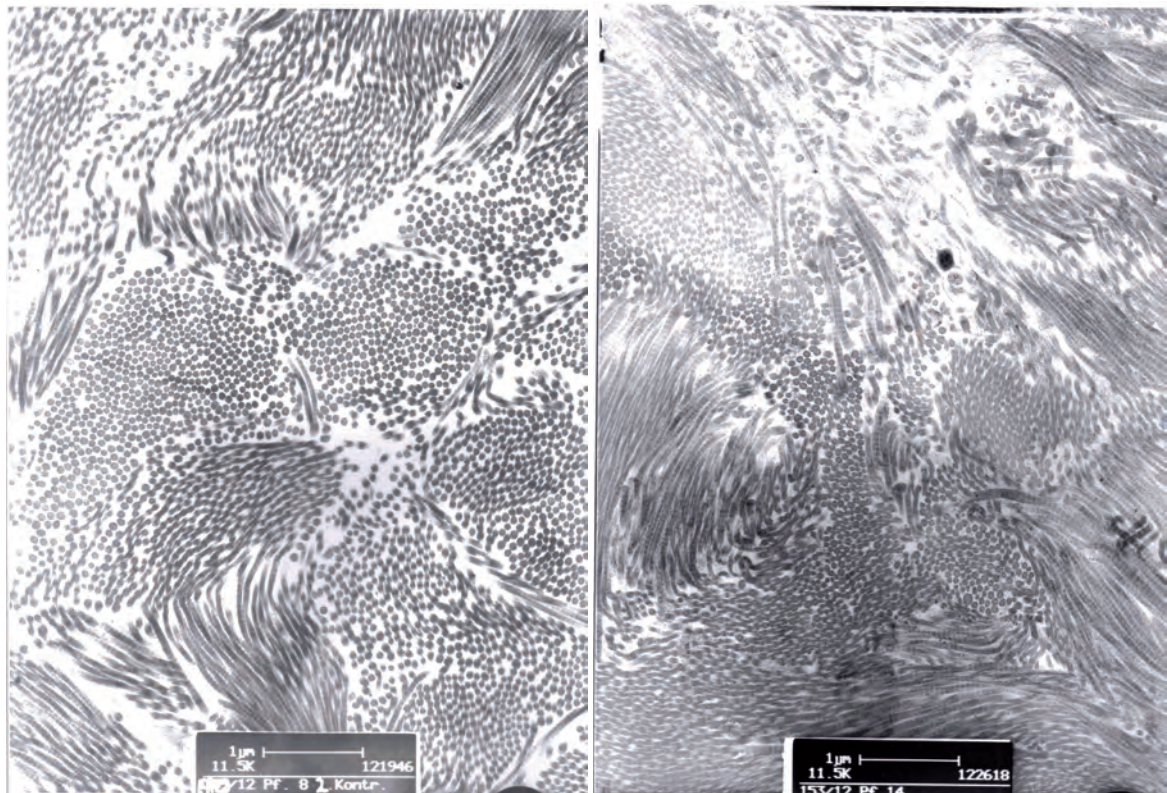


Abb. 21: Elektronenmikroskopische Darstellung des erkrankten Gewebes des M. interosseus medius. Nur teilweise lineare Anordnung der Kollagenfibrillen

Eine kombinierte Betrachtung mittels beider Formen der Elektronenmikroskopie würde ein detailliertes Bild der Ultrastruktur liefern als nur eines der beiden Verfahren. Im Laufe einer klinischen Studie entsprechend viel Gewebe zu entnehmen um beide Analyseverfahren durchzuführen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durchführbar. Zudem gibt es für die Betrachtung von Sagitalschnitten kein etabliertes quantitatives Verfahren. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie ergänzend zu der klinischen und sonographischen Beurteilung der Struktur auf die gemessenen Werte der Kollagenfibrillenbündel im Querschnitt zurückgegriffen. Das verwendete Verfahren lieferte objektive quantitative Ergebnisse.

Eine Aussage über eine erhöhte Stoffwechselaktivität oder eine gehemmte Entzündungsreaktion lassen sich durch diese Methode nicht treffen. Fortführende Untersuchungen wie die Bestimmung des COMP- und des Decorin-Gehalts wäre eine Möglichkeit nähere Informationen über eine erhöhte Stoffwechselaktivität zu erlangen. Beide Proteine stellen bei vermehrtem Vorkommen eine erhöhte

Fibrillogenese dar und können mittels mRNA-Gehaltsmessungen durch quantitative PCR bestimmt werden (Schnabel et al. 2008, Smith et al. 2006, Reed u. Izzo 2003).

Vorangegangene Studien die sich mit der Ultrastruktur des Sehnengewebes befassen liefern unterschiedliche Ergebnisse.

De Mattos Carvalho et al. (2011) untersuchten kollagenase-induzierte Schäden der OBS des Pferdes beider Vordergliedmaße. Eine Gliedmaße wurde 30 Tage postinjektion von Kollagenase mit kultivierten, autologen AT-MSC behandelt. Nach 60 und 150 Tagen wurde der entsprechende Sehnenabschnitt unter anderem histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei den stammzelltherapierten Sehnen einen erhöhten Anteil an Kollagen Typ I Fibrillen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Crovace et al. (2007) erlangt bei einer sehr ähnlichen Studie ebenfalls vielversprechende Ergebnisse. Nach Injektion von cMSC und BMMNC in Kollagenase -induzierte Core-Läsionen der OBS zeigte sich postmortal nach 21 Wochen ein deutlicher Unterschied in der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung. Der Gehalt an Kollagen Typ III und COMP war deutlich vermehrt bei den regenerativen Therapiegruppen. Ebenso zeigte die Fibrillenanzordnung und der Fibrillenverteilungs-Quotient Typ I / Typ II keinen Unterschied gegenüber intaktem Sehnengewebe. Als Placebo dienten Fibrinkleber und Kochsalzlösung. Bei den Placebogruppen zeigte sich ein dominanter Gehalt an Typ III Kollagen sowie eine nicht parallele Fibrillenanzordnung. Die Wahl des Placebos fiel in dieser Studie bewusst auf das verwendete DMEM. Von diesem standardisierten Nährmedium wird angenommen dass es für die Stammzellen und das Sehnengewebe unschädlich ist. Es verfügt eine breite Verwendbarkeit als Nährmedium unterschiedlicher tierischer Zellen. Durch seine nährstoffreiche Zusammensetzung ist eine Unterstützung des Heilungsprozesses nicht auszuschließen. Die Verwendung von Kochsalzlösung als Placebo konnte in den Vorbereitungen auf diese Studie nicht als geeignetes Medium beurteilt werden. Eigene Beobachtungen haben gezeigt dass sich Sehnengewebe des M. interosseus medius nach betropfen mit Kochsalzlösung weißlich verfärbt und sich eine ödematöse Schwellung entwickelt. Die Auswirkungen von Kochsalzlösung auf erkranktes Sehnengewebe sind bisher noch nicht abschließend geklärt. Die Wahl eines unbedenklichen und annehmbar unschädlichen Placebos wurde bei dieser Studie in den Vordergrund gestellt. Bei unklarer Auswirkung des Placebos bleibt eine

Verschlechterung des Heilungsverhaltens der Placebogruppe nicht ausgeschlossen. In diesem Fall würde dies zu einem falsch positiven Ergebnis der im Vergleich dazu verwendeten Therapien führen. Diese Studie wurde an der OBS des Pferdes durchgeführt. Die Ergebnisse lassen sich daher nur bedingt auf den Fesselträger übertragen.

Auch im Bereich der Anwendung von PRP wurden bisher positive Einflüsse auf ultrastruktureller Ebene nachgewiesen. Schnabel et al. (2008) ermittelte eine gesteigerte Kollagenneubildung und einen erhöhten den COMP- und Decorin-Gehalt auf equinen Fibroblasten-Zellkulturen nach Zugabe von PRP.

Der im Laufe der genannten Studien beobachtete positive Einfluss von MSC und PRP im Bereich der Sehnenheilung am Pferd konnten in dieser Studie nicht als signifikant ermittelt werden. Mögliche Ursachen sind die Ungleichheit der vorliegenden Defekte des M. interosseus in Bezug auf deren Entstehung und deren Erkrankungsdauer im Vergleich zu Kollagenase-induzierten Erkrankungen. Die in der Praxis entstandenen Erkrankungen des M. interosseus medius sind häufig Folge von wiederholter Überschreitung der Dehnungsgrenze der sehnenartigen Struktur und der daraus resultierenden Ruptur von Kollagenfibrillen. Inwiefern ein Sehnenschaden durch eine chirurgisch gesetzte Schnitteinzision oder verursacht durch Kollagenase mit einer natürlich entstandenen Erkrankung verglichen werden kann ist noch nicht geklärt.

Bei den beiden genannten Studien handelt es sich um ein unterschiedliches Zielgewebe. Die OBS und die Zellkultur equiner Fibroblasten lassen sich nur in gewissem Maße mit dem M. interosseus vergleichen.

Weitere Untersuchungen im Hinblick auf regenerative Therapien (MSC und PRP) befassen sich größtenteils mit den Ergebnissen der klinischen und sonographischen Untersuchung (Herthel 2001, Rosenbrock et al. 2004, Smith et al. 2003). Im vorangegangenen Teil der Gesamtstudie wird im Kapitel der Diskussion weiter auf betreffende Studien eingegangen. Das Fehlen von Kontrollgruppen und die Verwendung mehrere Agenzien in Kombination machen es in vielen Fällen schwer eine Wirksamkeit der einzelnen injizierten Präparate separat zu betrachten. Besonders die Kombination eines kontrollierten Bewegungsprogramms mit unterschiedlichen Injektions-Therapien fordert eine Placebogruppe. Nur so kann, wie in dieser Studie, der alleinige Heilungserfolg durch die Bewegung erfasst werden.

Der Einfluss der Erkrankungsdauer allgemein wurde insgesamt bei allen 30 Studienpferden statistisch ermittelt.

Der Einfluss der Erkrankungsdauer war signifikant in Bezug auf den MQA und die SA sowie die Parameter Fibrillendurchmesser, Fibrillenfläche und Fibrillenumfang. Folglich zeigen chronische Erkrankungen ein einheitlicheres Bild an Fibrillen über den beobachteten Zeitraum von 12 Wochen. 50% der Fibrillen befinden sich in einem schmalen Bereich bei zunehmender Erkrankungsdauer. Gleichzeitig nimmt die SD ab, d.h. die Fibrillen liegen näher am Mittelwert mit zunehmender Erkrankungsdauer. Diese Beobachtung lässt ebenfalls vermuten dass es sich bei der Heilung von Sehngewebe des M. interosseus medius um eine Verdichtung des Narbengewebes handelt, nicht aber um eine Wiederherstellung intakten Gewebes mit sowohl dünnen als auch dicken Fibrillen. Dass insbesondere chronisch erkrankte Tiere davon betroffen sind lässt darauf schließen, dass in ihrem Fall bei anhaltender Lahmheit die Funktion des gebildeten Narbengewebes nicht mit der Funktion einer intakten Sehne gleichzusetzen ist. Der Einfluss der Erkrankungsdauer zeigte sich als gruppenübergreifend. Es konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Therapiegruppen festgestellt werden. Die Beobachtung untermauert die Vermutung, dass chronische Erkrankungen auf ultrastruktureller Ebene schwer zu therapieren bzw. zu regenerieren sind. Die Darstellung der Anteile der Durchmesser der 4 Pferde mit einer Erkrankungsdauer von 24 Monaten deckt sich nicht mit dem Ergebnis des Tests auf Einfluss der Erkrankungsdauer der gesamten Studienpferde. Bei diesen 4 Pferden sehen wir einen deutlich höheren Anteil an Kollagenfibrillen mit Durchmessern von $<70\text{nm}$ zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Vergleich zu den beiden Kontrolluntersuchungszeitpunkten. Bei den 4 Pferden handelt es sich um eine Stichprobe der chronisch erkrankten Tiere. Das Ergebnis dieser Stichprobe lässt auf aussagekräftigere Ergebnisse hoffen bei Studien eine höheren Anzahl an Patienten.

Obwohl der M. interosseus medius als sehnenartige Struktur betrachtet wird nimmt er aufgrund seiner individuellen Zusammensetzung aus Muskelfasern und Kollagenkomponente neben der OBS und TBS eine gesonderte Rolle ein. Der Anteil der Muskelfasern kann zwischen 2 und 58% variieren. Über eine Abhängigkeit des Muskelanteils vom Lebensalter gibt es ebenfalls unterschiedliche Beobachtungen (Lempe 2007, Dyson et al. 1995, Oberbeck 1992, Schwarzkopf 2000). Der

Fibrillenanteil in % zeigte sich bei dieser Studie im Bereich von 45 bis 82%. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten und den Therapiegruppen festgestellt werden. Gleiche Beobachtungen wurden bei Ermittlung der Fibrillendichte gemacht. Im Vergleich zu gesundem Gewebe (Teil II der Studie) konnte lediglich bei Erkrankung der Lokalisation 8 ein signifikanter Unterschied der Fibrillendichte festgestellt werden. Es ist also anzunehmen, dass der Fibrillenanteil der Querschnittsfläche des Fesselträgers in % sich in einem relativ konstanten Fenster bewegt. Ein großer Einflussfaktor dieser Erscheinung ist die Methode der freien Wahl des Zählfensters des zu untersuchenden Abschnitts der Darstellung der Sehnenstruktur im Querschnitt. Dicht gelagerte Kollagenfibrillen wurden weitgehend gegenüber locker, unregelmäßig verteilten Fibrillen bevorzugt gewählt. Eine mögliche Artefakt Darstellung von aufgelöster Ultrastruktur durch die vorangegangene Aufbereitung des Gewebes vor der Mikroskopie konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde wurde bevorzugt dichteres Gewebe zur weiterführenden Analyse gewählt.

Im Laufe dieser Untersuchungen der kollagenen Ultrastruktur der M. interosseus medius konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten sowie den drei Therapiegruppen festgestellt werden. Weiterhin bestehen bleibt jedoch das Bild einer verbesserten Klinik und einer sonographischen Verbesserung aller Therapiegruppen.

Die klinische Untersuchung, speziell der Lahmheitsgrad, und die sonographische Untersuchung ergaben keinen signifikanten Einfluss auf das ultrastrukturelle Erscheinungsbild. Im Rückschluss ist es folglich mit Hilfe dieser Methode nicht möglich eine Belastbarkeit oder Freiheit von Lahmheit zu diagnostizieren oder zu prognostizieren. Es bleibt die Annahme bestehen dass selbst nach klinischer und sonographischer Besserung der Erkrankung ultrastrukturelle Veränderungen des Fesselträgers bestehen bleiben. Die beobachteten Tendenzen lassen jedoch vermuten dass bei Studien größeren Umfangs deutlichere und signifikante Ergebnisse zum Vorschein kommen.

Neben den angewandten Therapien stand bei dieser Studie das kontrollierte Bewegungsprogramm im Vordergrund. Die Notwendigkeit der Unterstützung der langwierigen Heilung von Sehngewebe beim Pferd wird von vielen Autoren als

essentiell und von großer Bedeutung angesehen (Blobel 1988, Lacitignola et al. 2008, Rijkenhuizen et al. 2007). Nur durch die Kontrolle der Bewegung kann eine fortschreitende Heilung von statten gehen. Die Bewegung passt sich demnach dem Heilungsstadium der Sehnenerkrankung an und dem Grad der Besserung im Laufe der regelmäßigen Kontrolluntersuchungen. Ziel ist es, durch sich steigernde Belastung das gebildete Narbengewebe schrittweise in seinem Aufbau und seiner Ausrichtung entlang der Stresslinie zu unterstützen. Rijkenhuizen et al. (2007) analysierten insgesamt 239 Pferde welche an einer Desmitis des M. interosseus medius oder einer Fesselträgerunsprungsdesmopathie erkrankten. Erkrankte Pferde, welchen freier Weidegang ermöglicht wurde, zeigten eine Tendenz zu weniger günstigen Heilungsergebnissen als Pferde, welche ein kontrolliertes Bewegungsprogramm verfolgten. Auch die Verhinderung von Rezidiven wird durch ein abgestimmtes, spezifisches Rehabilitationsprogramm optimiert.

9.5 Fazit

Die angewandte Methode der Transmissionselektronenmikroskopie liefert ein automatisiertes, quantitatives Verfahren zur Erfassung des Aufbaus einer sehnartigen Struktur auf ultrastruktureller Ebene. Zusammenfassend eignet sich die Methode gut für wissenschaftliche Zwecke zur Evaluierung von Therapien und Heilungsverhalten.

Im Laufe dieser Studie bestätigte sich die Vermutung anderer Autoren, dass die Erkrankung von Sehnengewebe, speziell in diesem Fall des M. interosseus medius, auch nach langer Heilungsdauer auf ultrastruktureller Ebene anhaltende Veränderungen zeigt (Buck 2003, Goodship 1993, Webbon 1973).

Ursache hierfür können zum einen die fehlende Eigenschaft der Regeneration geschädigter Kollagenfibrillen und deren Umgebung sein. Zum anderen wäre es möglich, dass eine generelle, eventuell schon weit vorausgegangene Umstrukturierung des gesamten Areals des geschädigten Bereichs der Sehnen, für das veränderte ultrastrukturelle Bild verantwortlich ist. In diese Gruppe der Erkrankungen könnten vor allem Pferde mit prädisponierenden Faktoren fallen. Die häufig beschriebenen hohen Rezidivraten sind diesem Phänomen mit hoher Wahrscheinlichkeit zuzuschreiben. Die in dieser Studie häufigen chronischen Erkrankungen des M. interosseus medius waren mit hoher Wahrscheinlichkeit

ebenfalls verantwortlich für ein Ausbleiben der signifikanten therapeutischen Effekte von PRP und MSC. Dennoch lassen die, wenn auch nicht signifikanten, beobachteten Unterschiede der Therapiegruppen und Untersuchungszeitpunkte einen möglichen Einfluss von PRP und MSC auf die Heilung von erkrankten Fesselträgern vermuten.

Insgesamt besteht großes Interesse, die Diagnostik und vor allem die Therapie von Erkrankungen des M. interosseus medius weitergehend zu optimieren. Die Aufgabe der Tierärzte sollte auch in Zukunft vermehrt darin bestehen, gewisse vorbeugende Arbeit zu leisten. Die Beratung im Hinblick auf die richtige Ausbildung junger Pferde und die weiterführende Ausbildung der Dressurpferde hoher Klassen steht dabei im Fokus. Mit dem vorhandenen Wissen über die Funktion und Dysfunktion des Sehnenbandapparates des Pferdes sowie dessen Unvermögen, sich von einer lang anhaltenden Fehlbelastung und folgenden Schädigung zu regenerieren, sollte im Bereich des Reitsports mehr Aufmerksamkeit erlangen.

10. Ausblick

Wünschenswert für die Zukunft sind Studien welche ihren Fokus auf die erfassbare Ultrastruktur des M. interosseus medius legen. Zunächst fehlen in dieser Hinsicht Studien an gesunden Pferdesehnen von großem Umfang und unterschiedlicher Altersgruppen. Sehr interessant wäre auch die Untersuchung von prädisponierten Pferdebeinen, wie z.B. die Fesselträger durchtrittiger Dressurpferde. Möglicherweise findet man dort bereits ein ähnliches ultrastrukturelles Bild des Fesselträgers wie bei klinisch chronisch erkrankten Pferden. Um eine effektivere Aussage über die Wirksamkeit verschiedener regenerativer Therapien zu erhalten, sind klinische Studien erforderlich, die nach Möglichkeit hohe Fallzahlen mit ähnlichem Krankheitsgeschehen beschreiben. Besonders wichtig erscheint hierbei, die akute Erkrankung zu erfassen. Die Voraussetzung von guter Therapie ist die empirisch nachgewiesene Wirksamkeit. Auch im Bereich der Tiermedizin sollte die evidenzbasierte Therapie nach Möglichkeit die Basis jeder Behandlungsmethode sein.

11. Zusammenfassung

Das Ziel dieser kontrolliert retrospektiven klinischen Studie war es das Heilungsverhalten des M. interosseus des Pferdes dem Einfluss von equinen mesenchymalen Stammzellen (MSC) und platelet rich plasma (PRP) auf ultrastruktureller Eben mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu untersuchen. 30 Pferde mit einer vordiagnostizierter Desmitis des M. interosseus medius wurden in die Studie aufgenommen und blind randomisiert in drei Gruppen eingeteilt. Die Pferde aus Gruppe A wurden mit einem Placebo behandelt (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und dienten als Kontrollgruppe. Die Pferde aus Gruppe B erhielten autologes PRP und die Pferde aus Gruppe C allogene, kryokonservierte MSC. Im Abstand von 6 Wochen wurden insgesamt 3 Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Diese beinhalteten eine klinische und sonographische Untersuchung sowie die Entnahme einer Feinnadelbiopsie aus dem Bereich des erkrankten Fesselträgers zur elektronenmikroskopischen Untersuchung. Alle Pferde verfolgten ein standardisiertes Bewegungsprotokoll.

Nach einem Zeitraum von 6 Monaten gaben die Patientenbesitzer in Form eines Fragebogens Auskunft über den Stand der Fesselträgererkrankung ihres Pferdes.

Diese Arbeit ist Bestandteil einer dreigliedrigen Gesamtstudie. Der vorangegangene erste Teil der Studie beinhaltete die klinische und die sonographische Untersuchung, sowie die Auswertung der Fragebögen. Im zweiten Teil der Gesamtstudie wurde der ultrastrukturelle Aufbau des M. interosseus medius gesunder Pferde, nach gleicher Methode dieser Arbeit (TEM), untersucht. Bei der durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Kollagenfibrillen in ihrem Querschnitt analysiert. Ziel dieser Studie war der Vergleich von gesunden mit erkrankten Fesselträgern, sowie die Erfassung des Heilungsverhaltens und des möglichen Einflusses der verwendeten Therapien. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten auf ultrastruktureller Ebene keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Therapiegruppen und zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten. Aus der vorangegangenen klinischen Studie wurde der Lahmheitsgrad und der das Gewebe charakterisierende Score-Wert, ermittelt im Zuge der sonographischen Untersuchung, aufgegriffen und statistisch mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchung verglichen. Beide Werte weisen keinen

Einfluss auf das erfasste ultrastrukturelle Erscheinungsbild der erkrankten Bereiche der Sehnen auf.

Pferde mit lang anhaltender Erkrankung des M. interosseus medius zeigten einen signifikant kleineren Verteilungsbereich der Fibrillen. Diese Erscheinung ist nicht gruppenspezifisch sondern bezieht sich gruppenunabhängig auf alle Studienpferde. Zusammenfassend bleibt die Erkrankungsdauer der einzig signifikante Einflussfaktor.

Im Vergleich der erkrankten Fesselträgerbiopsien der Studienpferde zu den gesunden Sehnenproben gewonnen von Schlachtpferden zeigten sich vor allem im Bereich der Werte des Median und der Standardabweichung gehäuft signifikante Unterschiede. Ein deutlicher Unterschied in der Größenanordnung der einzelnen Fibrillen, ähnlich dem von Narbengewebe, lies sich festhalten. In Bezug auf die Fibrillendichte und den Fibrillenanteil in % lies sich kein Unterschied zwischen erkranktem und gesundem Gewebe finden.

Insgesamt verbesserten sich alle Studienpferde klinisch und ultrasonographisch. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Therapiegruppen.

12. Summary

In this controlled study the influence of equine MSC (mesenchymal stroma cells) and PRP (platelet rich plasma) on the healing process of horses suffering from desmitis of the equine suspensory ligament (SL) was assessed by clinical, sonographic and ultrastructural examination. The ultrastructure of injured SL-tissue was analysed using transmission electron microscopy (TEM).

30 horses with a diagnosis of SL-desmitis were included. They were divided into 3 groups of 10 horses each. Animals in group A were treated with a placebo (Dulbecco's Modified Eagle Medium) and served as a control group. Horses of group B were treated with autologous PRP and Horses in group C were treated with allogenic, cryo-conserved MSC. Clinical and sonographic examinations were performed at 6 –weeks-intervals. During the initial examination and both controls a fine needle biopsy of the SL lesion area was obtained for the ultrastructural analysis, after the clinical and sonographic examination. All horses were trained according to a controlled exercise program. A questionnaire was used to assess the situation at 6 months.

This work is part of a complete study consisting of three different scientific works. Part one contains the clinical and sonographically examination as well as the questionnaires. Part two analysed the ultrastructure of healthy SL, using the same method as in this study. During the electronmicroscopic examination collagen fibrils were measured in their cross-section. The aim of this study was to compare the ultrastructure of healthy SL to those suffering from desmitis and to characterize the healing process of damaged SL tissue, including the possible influence of the applied therapies.

The ultrastructural analysis showed no significant difference between the samples of the three groups and the time of examination. Horses that had suffered from desmitis of the SL for a longer period of time (chronic desmitis) showed a significant smaller range of fibrils. This finding was overlapping the three groups.

In comparison to healthy SL the collagen fibrils of the horses suffering from desmitis showed a significant smaller median and standard deviation of their fibril cross sectional area. This manifestation is consistent with scar tissue. In terms of the total

density of fibrils and the amount of fibrils in % there was no significant difference between healthy and damaged SL tissue.

All patients improved clinically and sonographically during this study. There were however, no significant differences between the two treatment groups and the control group.

Literaturverzeichnis

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. In: *Blood*, Jg. 105, H. 4, S. 1815–1822. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
- ALEXANDER, R. MCN. (1998): *Elastic Mechanisms in Animal Movement*. Cambridge: Cambridge University Press.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F.; MUÑOZ, E.; PRADES, M. (2008): Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. In: *The Veterinary Record*, Jg. 162, H. 7, S. 208–211.
- ARNHOLD, S.; GOLETZ, I.; KLEIN, H.; STUMPF, G.; BELUCHE, L. A.; ROHDE, C. ET AL. (2007): Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. In: *American journal of veterinary research*, Jg. 68, H. 10, S. 1095–1105. Online verfügbar unter doi:10.2460/ajvr.68.10.1095.
- AWAD, H. A.; BUTLER, D. L.; BOIVIN, G. P.; SMITH, F. N.; MALAVIYA, P.; HUIBREGTSE, B.; CAPLAN, A. I. (1999): Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. In: *Tissue engineering*, Jg. 5, H. 3, S. 267–277.
- BACK, W.; SCHAMHARDT, H. C.; BARNEVELD, A. (1996): Are kinematics of the walk related to the locomotion of a warmblood horse at the trot? In: *Vet. Quart.* 18, S. 79–84.
- BATTAGLIA, T. C.; CLARK, R. T.; CHHABRA, A.; GASCHEN, V.; HUNZIKER, E. B.; MIKIC, B. (2003): Ultrastructural determinants of murine achilles tendon

strength during healing. In: Connective tissue research, Jg. 44, H. 5, S. 218-224.

BECKER, C. K. (1996): Function and dysfunction of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in horses. Dissertation. Utrecht University.
Department of General and Large Animal Surgery

BECKER, C. K.; CHERDCHUTHAM W.; ENZERINK E.; SPEK E. R.; VAN WEEREN P. R. (2001): A novel technique of taking tendon biopsies in the horse. A study on wound healing and the effect of exercise in immature superficial digital flexor tendons. In: Vet Comp OrthopTraumatol, H. 14, S. 214-221.

BIEWENER, A. A. (1998): Muscle-tendon stresses and elastic energy storage during locomotion in the horse. In: Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, Jg. 120, H. 1, S. 73–87.

BIRCH, H. L.; BAILEY, J. V.; BAILEY, A. J.; GOODSHIP, A. E. (1999): Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. In: Equine veterinary journal, Jg. 31, H. 5, S. 391–396.

BISCHOFBERGER, A. S.; KONAR, M.; OHLERTH, S.; GEYER, H.; LANG, J.; UELTSCHI, G.; LISCHER, C. J. (2006): Magnetic resonance imaging, ultrasonography and histology of the suspensory ligament origin: a comparative study of normal anatomy of warmblood horses. In: Equine veterinary journal, Jg. 38, H. 6, S. 508–516.

BLOBEL, K. (1988): Ein Beitrag zur Sehnenbehandlung bei Reit- und Trabrennpferden. In: Praktischer Tierarzt, Jg. 1988, Ausgabe 69, S. 10–14.

- BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R.; VAN SCHIE, H. T. M. (2010A): The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. In: Scandinavian journal of medicine & science in sports.
- BOSCH, G.; VAN SCHIE, H. T. M.; GROOT, M. W. DE; CADBY, J. A.; VAN DE LEST, C. H. A.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R. (2010B): Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. In: Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, Jg. 28, H. 2, S. 211-217.
- BOSCH, G., VAN WEEREN, P.R., BARNEVELD, A., VAN SCHIE, H.T.M. (2011): Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. In: The Veterinary Jg. 187, S. 92-98
- BREHM, W. (2008): Erfahrungen mit der Stammzell-Therapie von Sehnenläsionen beim Pferd. In: Vortragsband des BPT-Kongress, Hannover 2008, S. 20-26
- BROWN, NICHOLAS A. T.; PANDY, MARCUS G.; KAWCAK, CHRISTOPHER E.; MCILWRAITH, C. WAYNE (2003): Force- and moment-generating capacities of muscles in the distal forelimb of the horse. In: Journal of anatomy, Jg. 203, H. 1, S. 101–113.
- BUCK, C. (2003): Rasterelektronenmikroskopische Tendopathiediagnostik beim Pferd. Auswertung von Feinnadelbiopsaten. Dissertation. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie, Klinik für Pferde. Online verfügbar unter http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/buckc_2003.html.

- BUDRAS, K.-D.; RÖCK, S. (2000): Atlas der Anatomie des Pferdes. Lehrbuch für Tierärzte und Studierende. 4. Aufl. Hannover: Schlütersche GmbH & Co. KG.
- BURK, J.; DELLING, U.; BREHM, W. (2011): Einsatz von Stammzellen in der Therapie von Lahmheiten beim Pferd. In: Pferdespiegel 2011, Ausgabe 1, S. 9-15.
- CAPLAN, A. I. (2007): Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. In: Journal of cellular physiology, Jg. 213, H. 2, S. 341–347. Online verfügbar unter doi:10.1002/jcp.21200.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. (2006): Mesenchymal stem cells as trophic mediators. In: Journal of cellular biochemistry, Jg. 98, H. 5, S. 1076–1084. Online verfügbar unter doi:10.1002/jcb.20886.
- CHANG, J.; MOST, D.; STELNICKI, E. (1997): Gene Expression of Transforming Growth Factor Beta-1 in Rabbit Zone II Flexor Tendon Wound Healing: Evidence for Dual Mechanism of Repair. In: Plastic & Reconstructive Surgery, Jg. 100, S. 937-944.
- CHANG, J.; MOST, D.; THUNDER, R.; MEHRARA, B.; LONGAKER, M. T.; LINEAWEAVER, W. C. (1998): Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. In: The Journal of hand surgery, Jg. 23, H. 6, S. 1052–1058.
- COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N. ET AL. (2009): Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. In: Veterinary research communications. Online verfügbar unter doi:10.1007/s11259-009-9229-0.

- CREVIER-DENOIX, N.; POURCELOT, P. (1997): Additional research on tendon strains and stresses. In: American journal of veterinary research, Jg. 58, H. 6, S. 569–570.
- CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; SIENA, R. DE; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. (2007): Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. In: Veterinary research communications, Jg. 31 Suppl 1, S. 281–283 Online verfügbar unter doi:10.1007/s11259-007-0047-y.
- CYTEL STUDIO STATXACT VERS. 9.0.0 (2010). Statistical Software for Exact Non-parametric Inference, User Manual. CYTEL Inc., Cambridge, MA 02139, U.S.A.
- DAHLGREN, L. A.; NIXON, A. J.; BROWER-TOLAND, B. D. (2001): Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. In: American journal of veterinary research, Jg. 62, H. 10, S. 1557–1562.
- DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, H. O.; NIXON, A. J. (2005): Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. In: Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, Jg. 23, H. 1, S. 84–92. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.orthres.2004.05.007.
- DAHLGREN, L. A. (2009): Management of tendon injuries. In: Robinson, N.E. (Hrsg.): Current Therapy in Equine Medicine. Verlag W.B. Saunders, Philadelphia, S. 518-523

DAHLGREN, L. A.; NIXON, A. J. (2005): Cloning and expression of equine insulin-like growth factor binding proteins in normal equine tendon. In: American journal of veterinary research, Jg. 66, H. 2, S. 300–306.

DAHLGREN, L. A.; VAN DER MEULEN, M. C. H.; BERTRAM, JOHN E. A.; STARRAK, G. S.; NIXON, A. J. (2002): Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. In: Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, Jg. 20, H. 5, S. 910–919. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0736-0266(02)00009-8.

DÄMMRICH, K. (1991): Orthologie und Pathologie der Insertion bei Tieren. In: IX Tagung Pferdekrankheiten Equitana in Essen.

DE MATTOS CARVALHO, A.; GARCIA ALVES A. L.; DE OLIVEIRA, P. G. et Al (2011): Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. In: Journal of Equine Veterinary Science 31, 26-34.

DEL BUE M., S. RICCÒ R. RAMONI V. CONTI G. GNUDI AND S. GROLL (2008): Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. In: Veterinary research communications, Jg. 32, S. 51–55.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P. ET AL. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. In: Blood, Jg. 99, H. 10, S. 3838-3843.

- DIK, K. J.; VAN DEN BELT, A. J. (1991): Ultraschallfehldiagnostik bei Sehnenenerkrankungen des Pferdes. In: Pferdeheilkunde, H. 7, S. 83–90.
- DIXON, W. J. (CHIEF EDITOR) (1993). BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MÜLLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. (2006): Minimal criteria for defining multipotentmesenchymal stromal celss.The International Society for Cellular Therapy position statement.In: Cytotherapy, Jg. 8, S. 315-317.
- DYSON, S. J.; ARTHUR, R. M.; PALMER, S. E.; RICHARDSON, D. (1995): Suspensory ligament desmitis.In: The Veterinary clinics of North America. Equine practice, Jg. 11, H. 2, S. 177-215.
- DYSON, S. (2000): Proximal suspensory desmitis in the forelimb and the hindlimb.In: Proceedings. Annu Meet Am. Assoc. Equine Pract. S. 137-141.
- DYSON, S.; GENOVESE, R. L. (2002): The Suspensory Apparatus.In: Ross, M. W.; Dyson, S. J. (Hg.): Diagnosis and Management of Lameness in the Horse. USA: Saunders, S. 654-666.
- DYSON, S. (1994): Proximal suspensory desmitis in the hindlimb: 42 cases. In: The British veterinary journal, Jg. 150, H. 3, S. 279–291.
- DYSON, S. J. (2003): Proximal metacarpal and metatarsal pain: a diagnostic challenge. In: Equine Vet.Educ., H. 15, S. 134–138.

- DYSON, S. J.; ARTHUR, R. M.; PALMER, S. E.; RICHARDSON, D. (1995):
Suspensory ligament desmitis. In: The Veterinary clinics of North America.
Equine practice, Jg. 11, H. 2, S. 177–215.
- DYCE K., SACK W. O., WENSING C.J.G. (1996): Anatomie der Haustiere.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- FORSELL G. (1915): Untersuchungen über die Wirkungsweise von Beugesehen
am Vorderfuß des Pferdes. In: Z. Tiermed, 18, 184-8.
- FORTIER, L. A.; SMITH, R. K. W. (2008): Regenerative medicine for tendinous and
ligamentous injuries of sport horses. In: The Veterinary clinics of North
America. Equine practice, Jg. 24, H. 1, S. 191–201. Online verfügbar unter
doi:10.1016/j.cveq.2007.11.002.
- FORTIER, L. A., TRAVIS A. J. (2011): Stem cells in veterinary medicine. In: Stem
Cell Research & Therapy, Jg. 2, H. 9. online verfügbar unter:
<http://stemcellres.com/content/2/1/9>
- FRANCHI, M.; TRIRE, A., QUARANTA M.; OTTANI, O.; OTTANI V. (2007): Collagen
Structure Relates to Function. In: The Scientific World Journal 7.: S 404-420.
- FREEMAN, J. W.; SILVER, F. H. (2005): The effects of prestrain and collagen fibril
alignment on in vitro mineralisation of self assembled collagen fibers. In:
Connect. Tissue Res. 49: S. 41-47.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. (1976): Fibroblast
precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: Exp.
Hematol., Jg. 4, S. 267-274.

- GENOVESE, R. L.; N.W.RANTANEN U. B.S. SIMPSON (1987): The use of Ultrasonography in the diagnosis and management of injuries to the equine limb. In: Comp. contin. Educ. Pract. Vet, H. 9, S. 945–955.
- GENOVESE, R. L.; RANTANEN, N. W.; HAUSER, M. L.; SIMPSON, B. S. (1986): Diagnostic ultrasonography of equine limbs. In: The Veterinary clinics of North America. Equine practice, Jg. 2, H. 1, S. 145–226.
- GEYER, H. (2006): Beugesehnen und Fesselträger des Pferdes. In: Newsletter Stiftung Forschung für das Pferd, Jg. 3, H. 16.
- GILLIS, C. L. (1997): Rehabilitation of tendon and ligament injuries. In: Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Albuquerque 1999, S. 306-309.
- GIRTLER, D. (2001): Zur Biomechanik der Zehengelenke beim Pferd. Biomechanics of the digit in the horse. In: Pferdeheilkunde fundus, Jg. 17, H. 4, S. 357–360.
- GOLETZ, I. (2009): Isolierung und Charakterisierung equiner mesenchymaler Stammzellen für einen möglichen Einsatz im Tissue Engineering. Dissertation. Betreut von Prof.Dr.Dr. S. Arnhold. Gießen. Justus-Liebig Universität Gießen, Institut für Veterinäranatomie. Online verfügbar unter http://geb.uni-giessen.de/geb/frontdoor.php?source_opus=6828.
- GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L.; WILSON, A. M. (1994): The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. In: The Veterinary clinics of North America. Equine practice, Jg. 10, H. 2, S. 323–349.
- GOODSHIP, A. E. (1993): The Pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. In: Equine Vet. Educ. 5, S. 23-29.

- GUEST, D. J.; SMITH, M. R. W.; ALLEN, W. R. (2008): Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. In: Equine veterinary journal, Jg. 40, H. 2, S. 178–181. Online verfügbar unter doi:10.2746/042516408X276942.
- GUEST, D. J.; SMITH, M. R. W.; ALLEN, W. R. (2010): Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. In: Equine veterinary journal, Jg. 42, H. 7, S. 636-642.
- HALPER, J.; KIM, B.; KHAN, A.; YOON, J. H.; MUELLER, P. O. E. (2006): Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. In: BMC veterinary research, Jg. 2, S. 12. Online verfügbar unter doi:10.1186/1746-6148-2-12.
- HAUPT, J. L.; DONNELLY, B. P.; NIXON, A. J. (2006): Effects of platelet-derived growth factor-BB on the metabolic function and morphologic features of equine tendon in explant culture. In: American journal of veterinary research, Jg. 67, H. 9, S. 1595–1600. Online verfügbar unter doi:10.2460/ajvr.67.9.1595.
- HAUSER, M. L.; RANTANEN, N. W.; GENOVESE, R. L. (1984): Suspensory desmitis: diagnosis using real-time ultrasound imaging. In: Journal of equine veterinary science, Jg. 1984, H. 4, S. 258–262.
- HAYES, K. E. N. (1994): Degenerative Disorders Strikes Suspensories. In: Modern Horse Breeding, October, S. 24-27.

HENNINGER R. W.; BRAMLAGE L. R.; BAILY M.; BERTONE A. L.; WEISBRODE S. E. (1992): Effects of tendon splitting on experimentally-induced acute equine tendinitis. In: Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology: V.C.O.T, H. 5, S. 1-9.

HERTHEL, D. J. (2003): Clinical use of stem cells and marrow components to stimulate suspensory ligament healing. In: Diagnosis and Management of lameness in the horse, S. 673–674.

HERTHEL, D. J. (2001): Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components. In: American Association of Equine Practitioners, Jg. 2001, Ausgabe 47. Online verfügbar unter www.ivis.org/proceedings/AAEP/2001/91010100319.pdf.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SALPER-CORTENBACH I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING A. (2005): Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. In: Cytotherapy 7, S. 393-395.

IONITA, J.-C. (2010): Ausblick in die regenerative Medizin. Veranstaltung vom 7.10.2010. Bonn. Veranstalter: Merial GmbH

KADLER, K.E.; HOLMER, D.F.; TROTTER, J.A.; CHAPMAN, J.A. (1996): Collagen fibril formation. In: Biochem. J. 316, S. 1-11.

KALL, S.; NÖTH, U. (2004): Strategien und Perspektiven des Tissue engineering zur Regeneration von Sehngewebe. In: Journal der deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie e.V., Jg. 16, H. 29, S. 49–53.

- KAINER, R. A. (1989A): Clinical Anatomy of the equine foot. In: Vet. Clin. of North Am. Equine Pract. 5 (1), S. 1-27.
- KAINER, R. A. (1989B): Funktionelle Anatomie des Bewegungsapparates. In: Stashak, T. S. (Hg.) (1989): Adam's Lahmheiten bei Pferden. Deutsche Bearbeitung. 4. Aufl. Hannover: M. & H. Schaper GmbH. S. 77-93.
- KASASHIMA, Y.; TAKAHASHI, T.; SMITH, R. K. W.; GOODSHIP, A. E.; KUWANO, A.; UENO, T.; HIRANO, S. (2004): Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. In: Equine veterinary journal, Jg. 36, H. 4, S. 346–350.
- KEG P.; SCHAMHARD H. C.; WEEREN P. R.; BARNEVELD A. (1996): The effect of the high palmar nerve block and the ulnar nerve block on lameness provoked by collagenase-induced tendonitis of the lateral branch of the suspensory ligament. In: Vet. Quarterly 18, S. 103-105.
- KNUDSEN, O. (1976): Percutaneous tendon splitting--method and results. In: Equine veterinary journal, Jg. 8, H. 3, S. 101–103.
- KOCH, T. G.; BERG, L. C.; BETTS, D. H. (2008): Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. In: The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne, Jg. 49, H. 10, S. 1009–1017.
- KOCH, T. G.; BERG, L.C.; BETTS, D. H. (2009): Current and future regenerative medicine – principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. In: The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne, Jg. 50, H. 2, S. 155–165.

- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. (HG.) (2005): Anatomie der Haussäugetiere.
Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis in einem Band. 3. Aufl.,
Sachattauer Verlag, Stuttgart
- LACITIGNOLA, L.; CROVACE, A.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. (2008): Cell therapy
for tendinitis, experimental and clinical report. In: Veterinary research
communications, Jg. 32, H. 9, S. 33–38.
- LAWSON, S. E. M.; CHATEAU, H.; POURCELOT, P.; DENOIX, J.-M.; CREVIER-
DENOIX, N. (2007): Effect of toe and heel elevation on calculated tendon
strains in the horse and the influence of the proximal interphalangeal joint. In:
Journal of anatomy, Jg. 210, H. 5, S. 583–591. Online verfügbar unter
doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00714.x.
- LE BLANC, K.; TAMMIK, L.; HAYNESWORTH, S.E.; RINGDEN, O. (2003):
Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and
mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. In:
Scandinavian journal of immunology, Jg. 57, H.1, S. 11-20.
- LEMPE, R. A. (2007): Vergleichende magnetresonanztomographische Untersuchung
am plantaren Aspekt des Tarsus des Pferdes – sonographische und
histologische Korrelation des M. interosseus medius an der Hintergliedmaße
des Pferdes. Dissertation. Leipzig. Veterinärmedizinische Fakultät der
Universität Leipzig, Chirurgische Tierklinik. Online verfügbar unter
deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=984690476&dok_var=d1&dok_ext=pdf&
filename=984690476.pdf.
- LIAO, J.; VESELY, I. (2003): A structural basis for the size-related mechanical
properties of mitral valve chordae tendinae. In: Journal of Biomechanics, Jg.
36, H. 8, S. 1125-1133.

LIEBIG, H.G. (2004): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4. Auflage.
Stuttgart: Schattauer Verlag, S. 73-83.

LISCHER, C. J.; BISCHOFBERGER, A. S.; FÜRST, A.; LANG, J.; UELTSCHI, G.
(2006): Disorders of the origin of the suspensory ligament in the horse: a
diagnostic challenge. In: Schweizer Archiv für Tierheilkunde, Jg. 148, H. 2, S.
86–97.

MAGNUSSON, S. P.; QVORTRUP, K.; LARSEN, J. O.; ROSAGER, S.; HANSON,
P.; AAGAARDA, P.; KROGSGAARD, M.; KJAER, M. (2002): Collagen fibril
size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. In: Matrix
Biology 21, S. 369–377.

MCCLELLAN, P. D. (1986): A proposal for standardization in sonographic imaging I:
metacarpus and metatarsus. In: Equine Veterinary Science, Jg. 6, H. 6, S.
327-328.

MC ILWRAITH, C.W. (1989): Erkrankungen der Gelenke, Sehnen, Bänder sowie
ihrer Hilfseinrichtungen. In: Stashak, T. S. (Hg.) (1989): Adam's Lahmheiten
bei Pferden. Deutsche Bearbeitung. 4. Aufl. Hannover: M. & H. Schaper
GmbH. S. 463-475.

MIKIC, B.; SCHALET, B. J.; CLARK, R. T.; GASCHEN, V.; HUNZIKER, E. B. (2001):
GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and
composition of the Achilles tendon. In: Journal of Orthopaedic research, Jg.
19, H. 3, S. 365-371.

MOHR, W. (HG.) (1987): Spezielle pathologische Anatomie. Pathologie des
Bandapparates. Verlag Springer Verlag, Berlin.

- MÖLLER, H. D.; EVANS, C. H.; MAFFULLI, N. (2000): Current aspects of tendon healing. In: *Der Orthopäde*, Jg. 29, H. 3, S. 182–187.
- MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G. (2003): The role of growth factors in tendon and ligament healing. In: *Sports Med* 2003, H 33, S. 381-394.
- MOVIN, T.; GUNTNER, P.; A. GAD, A.; ROLF, C. (1997): Ultrasonography-guided percutaneous core biopsy in Achilles tendon disorder. In: *Scand. J. Med. Sci. Sports* 7, 244-248.
- MOYER, W.; RAKER, C. W. (1980): Diseases of the suspensory apparatus. In: *The Veterinary clinics of North America. Large animal practice*, Jg. 2, H. 1, S. 61–80.
- MURPHY, D. J.; NIXON, A. J. (1997): Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. In: *American journal of veterinary research*, Jg. 58, H. 1, S. 103–109.
- MUYLLE S.; DESMET P.; SIMOENS P.; LAUWERS H.; VLAMINCK L. (1998): Histological study of the innervation of the suspensory ligament of the forelimb of the horse. In: *Veterinary Record* 142, S. 606-610.
- NICKEL, R.; SCHUMMER A.; SEIFERLE E. (HG.) (2001): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Bewegungsapparat*. 6. Aufl., Paul Parey Buchverlag, Berlin.
- NIEMEYER, P.; SECKINGER, A.; SIMANK, H. G.; KASTEN, P.; SÜDKAMP, N.; KRAUSE, U. (2004): Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an in vitro study. In: *Der Orthopäde*, Jg. 33, H. 12, S. 1346–1353. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00132-004-0731-3.

OBERBECK, K. (1992): Klinische und morphologische Untersuchungen von Tendopathien der Beugesehnen beim Pferd. Dissertation. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; FAZZI, R.; GALIMBERTI, S.; DINI, F. ET (2007): Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. In: Tissue Eng. 13, S. 2949-2955.

PARRY, D. A.; BARNES, G. R.; CRAIG, A. S. (1978A): A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size and mechanical properties. Proc. R. Soc. London, Ser. B.: Biol. Sci. 203, S. 305-321.

PARRY, D.A.; BARNES, G.R.; CRAIG, A.S. (1978B): Tendon and ligament from the horse: An ultrastructural study of collagen fibrils and elastin fibers as a function of age. Proc. R. Soc. London, Ser. B.: Biol. Sci. 203, S. 293-303.

PATTERSON-KANE, J. C.; FIRTH, E. C.; PARRY, D. A.; GOODSHIP, A. E (1997): Age-related differences in collagen crimo patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. In: Aust. Vet J. Vol. 75. No. 1

PATTERSON-KANE, J. C.; BECKER, D. L.; RICH, T. (2012): The Pathogeneses of Microdamage in Athletes: The horse as a natural model for basic cellular research. In: Journal of Comparative Pathology, 2012, Vol. 147, S. 227-247

PELLETIER, M. H.; MALHOTRA, A.; BRIGHTON, T.; WALSH, W. R.; LINDEMAN, R. (2012): Platelet Function and Constituents of Platelet rich Plasma. In: Int J Sports Med 2013, 34, S. 74-80. Online verfügbar unter: DOI: 10.1055/s-0032-1316319

- PERKINS, N. R.; REID, S. W. J.; MORRIS, R. S. (2005): Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in Thoroughbred racehorses in New Zealand. In: New Zealand veterinary journal, Jg. 53, H. 3, S. 184–192.
- PLATT, D.; WILSON, A. (1994): The role of biomechanics research in the understanding of equine lameness. In: Equine veterinary journal, Jg. 26, H. 6, S. 435–436.
- PUGH, C. R. (1993): A simple method to document the locatiion of ultrasonographically detected equine tendon lesions. In: Vet Radiol Ultrasound, H. 34, S. 211–212.
- RAABE, O.; SHELL, K.; FIETZ, D.; FREITAG, C.; OHRNDORF A.; CHRIST H. J.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. (2013): Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. In: Cell and tissue research, Online verfügbar unter: DOI:10.1007/s00441-013-1574-1
- RANTANEN, N. W. (1986): General considerations for ultrasound examinations. In: The Veterinary clinics of North America. Equine practice, Jg. 2, H. 1, S. 29–32.
- RANTANEN, N. W. (1993): Proximal suspensory ligament injury. In: Journal of equine veterinary science, H. 13, S. 443.
- RAPP, H. J. (1997): Sonographische Sehnendiagnostik beim Pferd. Atlas der Anatomie mit pathologischen Fallbeispielen. Schattauer Verlag, Stuttgart.

- REED, C. C.; IOZZO, R. V. (2003): The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. In: Glycoconjugate Journal, Jg. 19, H. 4-5, S. 249-255.
- REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; MERFELD-CLAUSS, S.; TEMM-GROVE, C. J.; BOVENKERK, J. E.; PELL, C. L.; JOHNSTONE, B. H.; CONSIDINE, R. V.; MARCH, K. L. (2004): Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. In: Circulation, H. 109, S. 1292-1298.
- RENNIE, W. (1999): Teasing out the truth about collagen. In: J. Physiol., H. 15, S. 521.
- RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. D.; SMITH, R. (2007): Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. In: Trends in biotechnology, Jg. 25, H. 9, S. 409–416. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.tibtech.2007.07.009.
- RIGOZZI, S.; MÜLLER, R.; SNEDEKER, J. G. (2010): Collagen fibril morphology and mechanical properties of the Achilles tendon in two inbred mouse strains. In: Journal of Anatomy, Jg. 216, S. 724-731.
- RIJKENHUIZEN, A. B. M.; GIETEMANN, I. V.; VAN DER REIJ, T. C. M. (2007): Desmitis des Fesselträgers und Desmopathie des Fesselträgerursprungs an der Vorder- und Hintergliedmaße des Pferdes – eine retrospektive Studie über die Erfolge unterschiedlicher Behandlungen in der Praxis. In: Pferdeheilkunde fundus, Jg. 23, H. 4, S. 357–365.
- ROGGEL, F. (2013): Ultraschallsonographische und histologische Untersuchungen von künstlich erzeugten und mit kultivierten mesenchymalen Stromal Zellen aus Fettgewebe (Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells, AT-MSCs) behandelten Läsionen der oberflächlichen Beugesehne bei Pferden. Dissertation. Hannover Klinik für Pferde

- ROSENBROCK, A.; JACOBI, R.; PELLMANN, R.; JAUGSTETTER, H.; BREHM, W. (2004): Der Einsatz der Übertragung autologen Knochenmarks in der Pferdeorthopädie. In: DVG 18. Arbeitstagung der Fachgruppe "Pferdekrankheiten" Hannover 04./05.03.2004.
- ROONEY, J. R. (1973): Functional anatomy of the equine suspensory ligament. In: Modern veterinary practice, Jg. 54, H. 6, S. 43–45.
- RÜHMANN, K. (1999): Makroskopische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von Sehnenbiopaten und bioptierten Sehnen beim Pferd. Dissertation. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. (2005): Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. In: Journal of inflammation (London, England), Jg. 2, S. 8. Online verfügbar unter doi:10.1186/1476-9255-2-8.
- SALOMON, F.-V., GEYER H., GILLE U. (2005): Anatomie für die Tiermedizin, 2. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart
- SASAKI, N., ODAJIMA, S. (1996): Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. In: J. Biomech. 29, S. 1131-1136.
- SASAKI, N. ET AL. (2012): The role of collagen arrangement change during tendon healing demonstrated by scanning electron microscopy. In: J. of Electron Microscopy.0: S. 1-8
- SCHNABEL, L. V.; SONEA, H. O.; JACOBSON, M. S.; FORTIER, L. A. (2008): Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression

patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. In: Equine veterinary journal, Jg. 40, H. 3, S. 260–265. Online verfügbar unter doi:10.2746/042516408X278030.

SCHNABEL, L. V.; LYNCH, M. E.; VAN DER MEULEN, M. C. H.; YEAGER, A. E.; KORNATOWSKI, M. A.; NIXON, A. J. (2009): Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. In: Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. Online verfügbar unter doi:10.1002/jor.20887.

SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MILLER, B. J.; MCDERMOTT, W. G.; JACOBSON, M. S.; SANTANGELO, K. S.; FORTIER, L. A. (2007): Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. In: Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, Jg. 25, H. 2, S. 230–240. Online verfügbar unter doi:10.1002/jor.20278.

SCHNEIDER, J. (2006): Tendinitis. In : Handbuch Pferdepraxis. Dietz, O., Huskamp, B., 3. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. S. 928-932.

SCHULZE, T.; BUDRAS, K.-D. (2008): Zur klinisch-funktionellen Anatomie des M. interosseus medius der Hintergliedmaße im Hinblick auf die Insertionsdesmopathie des Pferdes – Kernspin-, computertomographische und morphologische Untersuchungen. About the clinical and functional anatomy of the suspensory ligament (M. interosseus medius) in the hind limb in relation to high suspensory desmitis of the horse. In: Pferdeheilkunde fundus, Jg. 24, H. 3, S. 343–350.

- SCHWARZKOPF, I. (2000): Sonographische, magnetresonanztomographische und histologische Untersuchungen am Musculus interosseus medius des Warmblutpferdes. Dissertation. Wien. Universität Wien.
- SEIFERLE E., FREWEIN J. (1992): Aktiver Bewegungsapparat, Muskelsysteme, Myologia. In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Hrsg): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, 6. Auflage, Band 1. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 273-606.
- SILVER, I. A.; BROWN, P. N.; GOODSHIP, A. E.; LANYON, L. E.; MCCULLAGH, K. G.; PERRY, G. C.; WILLIAMS, I. F. (1983): A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. In: Equine veterinary journal. Supplement, H. 1, S. 1–43.
- SMITH, J. J.; ROSS, M. W.; SMITH, R. K. W. (2006): Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. In: Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T, Jg. 19, H. 1, S. 43–47.
- SMITH, R. K. W.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. (2003): Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. In: Equine veterinary journal, Jg. 35, H. 1, S. 99–102.
- SMITH R. K., BIRCH H. L., GOODMAN S., HEINEGRAD D., GOODSHIP A. E. (2002): The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration-hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. In: Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 133, S.1039-1050.

SMITH, R. K. W.; WEBBON, P. M. (2005): Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? In: British journal of sports medicine, Jg. 39, H. 9, S. 582–584. Online verfügbar unter doi:10.1136/bjism.2005.015834.

SÖDERSTEN F.; EKMAN S.; SCHMITZ M.; PAULSSON M.; ZAUCKE F. (2006): Thrombospondin-4 and cartilage oligomeric matrix protein from heterooligomers in equine tendon. In: Connect Tissue Res. 47, 85-91

SOFFLER, C.; HERMANSON, J. W. (2006): Muscular design in the equine interosseus muscle. In: Journal of morphology, Jg. 267, H. 6, S. 696–704. Online verfügbar unter doi:10.1002/jmor.10433.

SORRELL, J.M., BABER, M.A., CAPLAN, A.I. (2009): Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. In: Tissue Eng. Part A 15, S. 1751-1761.

STADTBÄUMER, G. (1988): Ultraschalldiagnostik bei Sehnenerkrankungen des Pferdes. In: Pferdeheilkunde fundus, Jg. 1988, H. 4, S. 125–137.

STADTBÄUMER, G. (1990): Ein Vergleich der Ergebnisse der klinischen mit der sonographischen Untersuchung bei der Sehnenerkrankung des Pferdes. Dissertation. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover.

STANEK, C. (2004): Tendopathien. In: Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermedizin, Dietz, O., Litzke, L.-F., 6. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 219-226

STASHAK, T. S. (HG.) (1989): Adam's Lahmheiten bei Pferden. Deutsche Bearbeitung. 4. Aufl., M. & H. Schaper Verlag, Hannover

TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. (2007): Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? In: Equine veterinary journal, Jg. 39, H. 2, S. 172–180.

UELTSCHI, G. (1989): Zur Diagnose von Interosseusläsionen an der Ursprungsstelle. In: Pferdeheilkunde H. 5, S. 65-69.

Urhahne, P. (2005): Klinische Studie zur Behandlung häufiger Erkrankungen des Bewegungsapparates des Pferdes mittels fokussierter extrakorporaler Stoßwellentherapie (ESWT). Dissertation. München. Ludwig-Maximilians-Universität, Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes.

URSCHEL, J. D., SCOTT P.G., WILLIAMS, H.T. (1988): The effect of mechanical stress on soft and hard tissue repair, a review. In: Br. J. Plast. Surg. 41: S182-186.

VAN SCHIE, H. T. M.; DE VOS, R. J.; DE JONGE, S.; BAKKER, E. M.; HEIJBOER, M. P.; VERHAAR, J. A.; TOL, J. L.; WEINANS, H. (2010): Ultrasonographic tissue characterisation of human Achilles tendons: quantification of tendon structure through a novel non-invasive approach. In: Br. J. Sports Med. 44, S. 1153-1159.

WAGELS, R. (2000): Die Biopsie der oberflächlichen und tiefen Beugesehne des Pferdes. Methodik und klinische Verlaufsuntersuchung. Dissertation. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Pferde. Online verfügbar unter: <http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=95996519x>.

WASELAU, M.; WESELY SUTTER, W.; GENOVESE, R. L.; BERTONE, A. L. (2008): Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for

treatment of midbody suspensory ligament desmitis in standardbred racehorses. In: Journal of the American Veterinary Medical Association, Jg. 232, H. 10, S. 1515–1520. Online verfügbar unter doi:10.2460/javma.232.10.1515.

WEBBON, P. M. (1973): Equine tendon stress injuries. In: Equine veterinary journal, Jg. 5, H. 2, S. 58–64.

WEBBON, P. M. (1977): A post mortem study of equine digital flexor tendons. In: Equine veterinary journal, Jg. 9, H. 2, S. 61–67.

WEBBON, P. M. (1979): The racing performance of horses with tendon lesions treated by percutaneous tendon splitting. In: Equine veterinary journal, Jg. 11, H. 4, S. 264–265.

WEBBON, P. M. (1986): Preliminary study of tendon biopsy in the horse. In: Equine veterinary journal, Jg. 18, H. 5, S. 383–387.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. (1997): Platelet gel: an atologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. In: J. Oral Mixillofac. Surg., Jg. 55, S. 1294–1299.

WILLIAMS, I. F.; HEATON, A.; MCCULLAGH, K. G. (1980): Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. In: Research in veterinary science, Jg. 28, H. 3, S. 302–310.

WILLIAMS, I. F.; MCCULLAGH, K. G.; GOODSHIP, A. E.; SILVER, I. A. (1984A): Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. In: Research in veterinary science, Jg. 36, H. 3, S. 326–338.

- WILLIAMS, I. F.; MCCULLAGH, K. G.; SILVER, I. A. (1984B): The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. In: Connective tissue research, Jg. 12, H. 3-4, S. 211–227.
- WILSON, D. A.; BAKER, G. J.; PIJANOWSKI, G. J.; BOERO, M. J.; BADERTSCHER, R. R. (1991): Composition and morphologic features of the interosseous muscle in Standardbreds and Thoroughbreds. In: American journal of veterinary research, Jg. 52, H. 1, S. 133–139.
- WISSDORF H.; GERHARDS H.; HUSKAMP B.; DEEGEN E. (2002): Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes. Verlag M.&H. Schaper, Alfeld, Hannover
- YOON, J. H., HALPER, J. (2005): Tendon proteoglycans: biochemistry and function. In: J Musculoskelet Neuronal Interact 2005, H. 5., S. 22-34.
- YOUNG, J.H. (1993): Degenerative Suspensory Ligament Desmitis. In: Hoofcare Lameness, Jg. 61, S. 6-19.
- YOUNG, R. G.; BUTLER, D. L.; WEBER, W.; CAPLAN, A. I.; GORDON, S. L.; FINK, D. J. (1998): Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. In : J. Orthop. Res., H. 16, S. 406-413.
- ZACHOS, TERRI A.; BERTONE, ALICIA L. (2005): Growth factors and their potential therapeutic applications for healing of musculoskeletal and other connective tissues. In: American journal of veterinary research, Jg. 66, H. 4, S. 727–738.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für die Übernahme der Doktorvaterschaft, sowie die gewissenhafte Betreuung und Unterstützung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner externen Doktormutter Dr. med. Ute Lockemann. Ihre positive Einstellung und ihre Motivation auf allen Ebenen Unterstützung zu leisten war eine gern angenommene Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Frau Dr. Dr. Christina Becker richten. Als Teilhaberin der Pferdeklinik Becker und Leser war sie der Initiator und Umsetzer dieser Studie. Ihre langjährige Erfahrung im Gebiet der Sehnenerkrankungen des Pferdes und ihrer Tätigkeit als Tierärztin ermöglichten eine erfolgreiche Zusammenarbeit. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die prägende, lehrreiche Zeit in Borstel-Hohenraden.

Für die Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bilder im Labor des anatomischen Institutes für Anatomie und experimentelle Morphologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf gilt mein Dank Prof. Dr. med Udo Schumacher und seinem Team. Besonders möchte ich mich bei Frau Elke Schäfer bedanken für die gründliche Einarbeitung und die gute Betreuung während der Laborarbeiten.

Bei der statistischen Auswertung dieser Studie leisteten mir Dr. Failing und die AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig Universität Giessen Unterstützung und Aufklärung. Vielen Dank dafür.

Ein außergewöhnlich gutes Verhältnis zu meiner Vorgängerin und Teamkollegin der Fesselträgerstudie Lisa Butterweck hat die Ausarbeitung und Zusammenarbeit sehr erleichtert. Vielen Dank dafür Lisa.

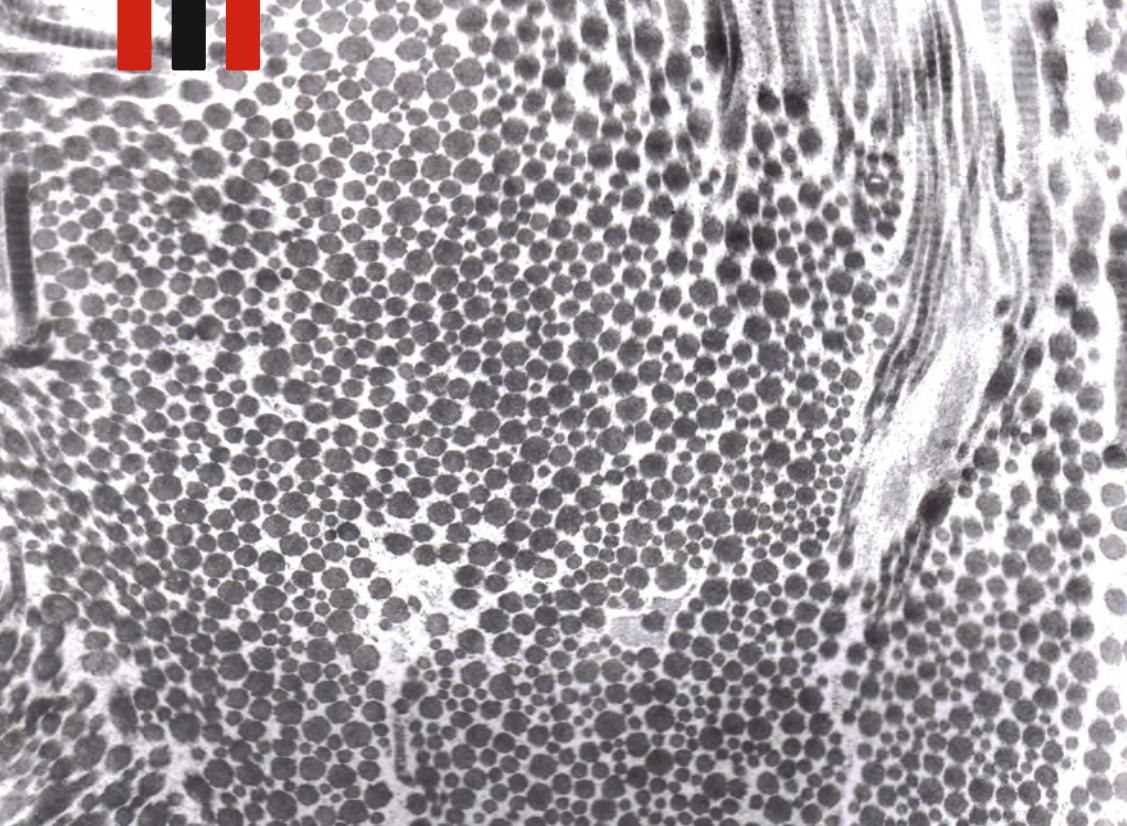
Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Freunden und vor allem meiner Familie und meinem Partner, welche mich lückenlos und tatkräftig unterstützt haben.

Erklärung

Ich erkläre hiermit: ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Waging am See, den 14.12.2015

Eva-Maria Klose



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6502-7



9 783835 196502 7